

**Immunhistochemische Untersuchungen
xenotransplantierter humaner
Adenokarzinome an Nacktmäusen
und Korrelation zur
immunszintigraphischen Darstellung**

Disbui. München

1987

Eva Matejkova



Aus der Abteilung für Nuklearbiologie der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung m.b.H. Neuherberg
Leiter: Prof. Dr. H. Kriegel

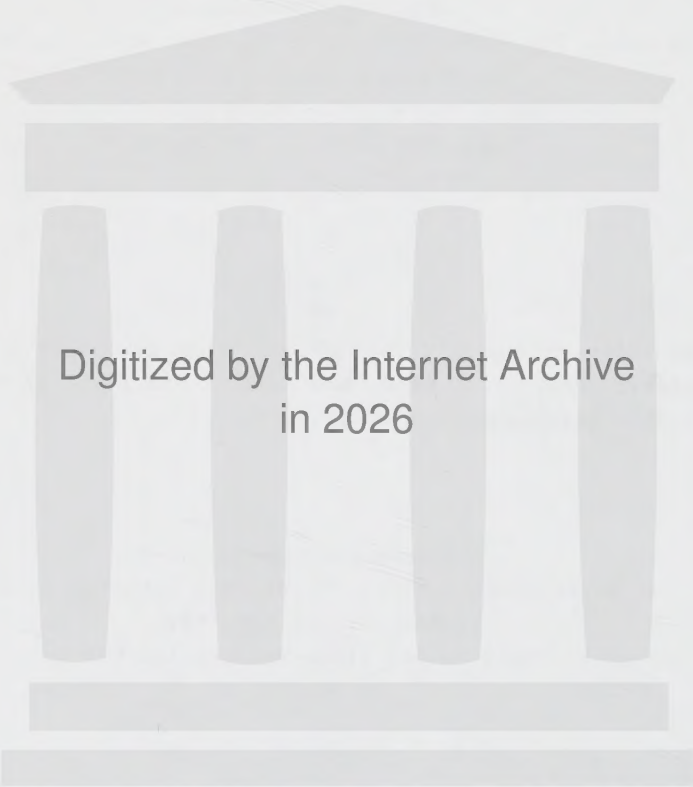
Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. E. Dahme

Immunhistochemische Untersuchungen xenotransplantierte
humaner Adenokarzinome an Nacktmäusen und Korrelation zur
immunszintigraphischen Darstellung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Eva Matejkova
aus Prag

München 1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. E. Dahme
Korreferent: Prof. Dr. E. Sinowatz

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
Häufige Abkürzungen	5
A. Einleitung	6
B. Literaturübersicht	
1. Allgemeines über Balb/c nu/nu	7
2. Technik, Ort und Zeitpunkt der Tumortransplantation	8
3. Morphologievergleich zwischen Patiententumor und den Passagen bei den Nacktmäusen	10
4. Ablauf des Wachstums neoplastischer Xenotransplantate auf der Nacktmaus	14
5. Immunhistochemie	
5.1. Prinzip	16
5.2. Methoden	18
5.3. Aussagefähigkeit	22
6. Bisbenzimidanwendung	23
7. Radioimmunszintigraphie	24
C. Problemstellung	29
D. Eigene Untersuchungen	
1. Material und Methoden	
1.1. Versuchstiere	31
1.2. Tumoren	31
1.3. Behandlung der Tumoren	
1.3.1. Transplantation	33
1.3.2. Einfrieren des Operationsmaterials und der passagierten Tumoren	34

1.4. Histologische Methoden	
1.4.1. Allgemeines	35
1.4.2. Immunhistochemische Untersuchungen	
1.4.2.1. Direkte Immunhistochemie	37
1.4.2.2. Indirekte Immunhistochemie	38
1.4.3. Beurteilung der Schnitte	39
1.4.4. Speziesspezifische Kernfärbung zur Differenzierung humaner und muriner Zellen	39
1.5. Immunszintigraphie und Biokinetik im Vergleich zur Tumorphistologie	
1.5.1. Immunszintigraphie	40
1.5.2. Ganzkörpermessung zur Ermittlung der Retention applizierter Aktivität	41
1.5.3. Biokinetische Studien	42
1.5.4. Immunhistochemische Untersuchungen szintigraphierter Tumoren	43
2. Ergebnisse	
2.1. Immunhistochemie	
2.1.1. Direkte Immunhistochemie	44
2.1.2. Indirekte Immunhistochemie	49
2.2. Immunhistochemische Folgeuntersuchungen über mehrere Passagen	
2.2.1. Kolonkarzinom (ColCa 1)	50
2.2.2. Hodenkarzinom (HoCa 5)	56
2.2.3. Mammakarzinom (MaCa F)	60
2.2.4. Magenkarzinom (MagCa 1)	60
2.3. Bisbenzimiddarstellung	63
2.4. Zusammenfassung der immunhistochemischen und histologischen Untersuchungen	63

2.5. Biokinetische Untersuchungen	
2.5.1. Kolonkarzinom (ColCa 1 (3.P.))	64
2.5.2. Mammakarzinom (MaCa F (35.P.))	68
2.5.3. Hodenkarzinom (HoCa 5 (4.P.))	71
2.6. Bestimmung der Ganzkörperretention	73
2.7. Immunszintigraphische Darstellung	
2.7.1. Kolonkarzinom (ColCa 1 (3.P.))	
mit I 131 Anti-CEA Ak	78
2.7.2. Mammakarzinom (MaCa F(35.P.))	
mit I 131 Tumak Ak	80
2.7.3. Hodenkarzinom (HoCa 5 (4.P.))	
mit I 131 Tumak Ak	81
2.8. Histologie der szintigraphierten Tumore	84
2.9. Gegenüberstellung von Tumorgewicht, Aktivitätskonzentration, szintigraphi- scher Darstellbarkeit, Histologie und Ganzkörperretention	84
E. Diskussion	87
F. Zusammenfassung - Summary	99
G. Literaturverzeichnis	103
Lebenslauf	123

Häufige Abkürzungen:

3AEC-Lsg.	Farbsubstrat zum Nachweis des Enzyms Meerrettich Peroxidase; enthält 3-amino-9-ethyl carbazol
Anti-Maus IgG	polyklonaler Antikörper gegen murines γ -Globulin gerichtet. Dieser ist speziesspezifisch gereinigt und weist Kreuzreaktionen mit anderen Spezies in der Höhe von 0,1 % auf
Anti-Mensch IgG	gegen humanes γ -Globulin gerichtet, Eigenschaften s.h. Anti-Maus IgG
CEA	Karziñoembryonales Antigen
ColCa 1	Kolonkarzinom
FKS	fetales Kälberserum
HCG	humanes Choriogonadotropin
HoCa 5	Hodenkarzinom
HRP	horseradish peroxidase Meerrettich Peroxidase, ein wichtiges an den Antikörper koppelbares Enzym in der Immunenzymchemie
MaCa F	Mammakarzinom
MagCa 1	Magenkarzinom
Ma-10-11	gegen menschliches Gewebe gerichteter monoklonaler Antikörper aus einer Ratte/Maus Fusion
PBS	Phosphat buffered saline, eingesetzter Puffer mit pH 7,4

Tumoren:

Patiententumor	operativ gewonnenes menschliches Tumorgewebe
Ausgangstumor	der in der Maus erfolgreich herangewachsene Patiententumor
1. Passage	der transplantierte und herangewachsene Ursprungstumor

A. EINLEITUNG:

In der experimentellen Onkologie bilden xenotransplantierte und erfolgreich passagierte, humane Karzinome eine wichtige Grundlage für das Testen und Entwickeln neuer diagnostischer und therapeutischer Verfahren.

Seit 1969 ist deshalb die Nacktmaus (Balb/c-nu/nu) auf Grund der fehlenden T-Lymphozyten-Produktion und der damit reduzierten Transplantatsabstoßung ein wichtiges Versuchsmodell der onkologischen Forschung geworden.

Xenotransplantierte menschliche Tumoren konnten nun beliebig oft weiterpassagiert werden und somit langfristige onkologische Experimente ermöglichen.

Um aus den durchgeführten Experimenten an den xenotransplantierten Tumoren Schlüsse ziehen zu können, ist der Nachweis der unveränderten Tumorphistologie von großer Bedeutung. Eine innerhalb der Passagen variierende Parenchymmorphologie oder eine überproportionale Zunahme des versorgenden murinen Stromas innerhalb der Xenotransplantate könnten zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen.

B. LITERATURÜBERSICHT:

1. Allgemeines über Balb/c-nu/nu

Erstmals wurde die Nacktmaus, eine Balb/c Mutante, 1962 von Isaacson und Cattanaach erwähnt, als sie spontan in einer geschlossenen Zucht des Ruchill Hospitals in Glasgow auftrat (Isaacson, 1962).

1966 untersuchte Flanagan ein Männchen und ein phänotypisch normal aussehendes Weibchen (Flanagan, 1966). Er bezeichnete sie als autosomal rezessive Mutante und führte das Symbol "nu" ein. Besonders auffällig war schon damals die schlechte Kondition und Kurzlebigkeit der Homozygoten ("nu/nu").

Erst 1968 entdeckte man die Thymusaplasie und die damit verbundene Schwächung des Immunsystems als wichtige Eigenschaft dieser Mutante (Pantelouris, 1968).

Von diesem Zeitpunkt an fand die Nacktmaus (Balb/c-nu/nu, später auch NMRI-nu/nu) nicht nur als immunologisches Modell zur Erforschung der Thymusfunktion eine starke Verbreitung, sondern wurde auch für die experimentelle Onkologie bedeutsam. Dies wurde besonders deutlich, als in Kopenhagen die erste erfolgreiche Transplantation menschlichen Tumorgewebes (Mamma- und Kolonadenokarzinom) auf der Nacktmaus gelang (Rygaard, 1969). Auch andere Forschungsbereiche wie die Mikrobiologie und Parasitologie nutzten die Eigenschaften der Nacktmaus für viele Fragestellungen (Prabhakaran, 1975). Während dieser Zeit wurden die Methoden der keimfreien Haltung und der erfolgreichen Reproduktion der Mutante vorangetrieben.

Die Nacktmaus ist nicht, wie zunächst angenommen, thymusaplastisch, sondern sie besitzt ein Thymusrudiment



(De Soussa, 1969, Rygaard, 1969): Dieses besteht aus zwei kleinen Lappen, die in weißes und braunes Fettgewebe eingelagert sind. Diejenigen Teile der Rudimente, welche die thymusabhängigen Lymphozyten (T-Zellen) enthalten, sind leer (Lefkovitz, 1977, Rygaard, 1981). Ein winziges lymphatisches Rudiment liegt am kaudalen Pol der Lappchen. Die außerdem verschiedentlich gefundenen zystischen Bildungen stehen nur im räumlichen Zusammenhang zum Thymusrudiment, können aber nicht als solches betrachtet werden (Holub et al., 1975).

Bei Verwendung von anderen Versuchstieren für ähnliche Fragestellungen ist oft eine Immunsuppression durch Cortison, Cyclosporin, Gamma-Bestrahlung oder eine Thymektomie erforderlich. Diese Behandlungen, deren Einfluß auf die Versuchsergebnisse nicht abzusehen sind, können bei den Nacktmäusen unterbleiben.

2. Technik, Ort und Zeitpunkt der Tumortransplantation

Um reproduzierbare Ergebnisse bei der Transplantation malignen Gewebes zu erhalten und somit sinnvolle Vergleiche anstellen zu können, sind sorgfältige Überlegungen sowohl hinsichtlich der Transplantation, des Ortes sowie des Alters der Tiere erforderlich.

Folgende Techniken wurden in der Literatur beschrieben: Etablierte Tumorzelllinien wurden resuspendiert und jeweils $0,5 \times 10^6$ bis 6×10^6 Zellen der Maus injiziert (Auerbach et al., 1978a, Sordat et al., 1974), oder es wurden vitale Anteile menschlicher Tumoren verwendet, die als Einzelsuspension verabreicht wurden (Auerbach et al., 1978b, Bastert et al., 1969).

Die weitere Möglichkeit ist die Entnahme kleinster

Gewebeteile ($2-5 \text{ mm}^3$) aus den resezierten, menschlichen Tumoren und deren direkte Übertragung auf Nacktmäuse (Hajdu et al., 1978, Miwa et al., 1977, Rygaard, 1969a). Dabei wurde festgestellt, daß aus Metastasen und Zellkulturen stammende Zellen deutlich schneller wuchsen als die aus menschlichen Primärtumoren, was vermutlich auf eine positive Wachstumsselektion zurückgeführt werden kann (Forthmayer, 1981).

Die Transplantationsorte (kranial/kaudal, dorsal/ventral oder intraperitoneal, subkutan, intradermal) wurden oft nicht exakt beschrieben, obwohl seit 1978 bekannt war, daß der Applikationsort das Wachstum des Tumors beeinflußt (Auerbach, 1982, Auerbach et al., 1978a). Sowohl bei der subkutanen als auch bei der intradermalen Tumorzellapplikation waren die Angehraten und das Tumorstadium gegenüber der intraperitonealen Verabreichung deutlich erhöht. Das raschere Wachstum erfolgte auf den lateralen und dorsalen Thoraxbereichen, das langsamere an der dorsolateralen Lumbalregion.

Ein Zusammenhang zwischen der lokal unterschiedlichen Durchblutung des Rumpfes und dem Tumorstadium wurde angenommen. Die Applikation der Tumorzellen selbst führt zu einer vermehrten lokalen Durchblutung (Jirtle et al., 1978, Auerbach et al., 1978a).

Für die Angehrate ist auch der Transplantationszeitpunkt relevant, da das Lebensalter des Empfängertieres mit der Konzentration der stark zytotoxischen Natural Killer Cells (NK-Zellen) korreliert. Bei Nacktmäusen haben auf Grund des T-Zellen Mangels die NK-Zellen eine besonders wichtige Funktion, da diese Zellen kompensatorisch einen größeren Teil der Abwehrreaktion übernehmen müssen als bei einer voll funktionsfähigen Thymusdrüse (Lotzova et al., 1978). Bis zum Alter von 3 Wochen konnten bei der Nacktmaus keine

NK-Zellen nachgewiesen werden. Die höchsten Zahlenwerte werden mit 6-8 Wochen erreicht, um sich dann im Alter von 6-12 Monaten auf ein relativ niedriges Niveau einzustellen. (Kiessling et al., 1978, Maruo et al., 1982). Zum Zeitpunkt der höchsten NK-Aktivität ist die Tumorangehrate wesentlich geringer und auch die Wahrscheinlichkeit der Regression gewachsener Tumoren erhöht sich. Tiere, die innerhalb der ersten 3 Wochen Implantate erhalten, zeigen häufiger Metastasenbildungen als ältere Nacktmäuse (Hanna et al., 1981).

Auf Grund der Hormonabhängigkeit einiger Tumoren muß das Geschlecht bezüglich Angehrate und Wachstumseigenschaften mitberücksichtigt werden. Nach einigen Passagen kann sich jedoch die Geschlechtspräferenz der wachsenden Tumoren wieder verringern, da nach mehreren Passagen eine Anpassung an das Wirtsgewebe erfolgen kann (Giovannella et al., 1978).

3. Morphologievergleich zwischen Patiententumoren und den Passagen bei Nacktmäusen

Schon um die Jahrhundertwende ergab sich während der ersten durchgeführten Transplantationen malignen, menschlichen Gewebes auf Versuchstiere die Frage nach Übereinstimmung zwischen dem resezierten, menschlichen Gewebe und dem im Tiermodell herangewachsenen Tumor (Ehrlich, 1905, Ehrlich et al., 1906).

Bei Tumortransplantationen entweder in die Backentaschen von Hamstern oder auf Cortison vorbehandelte Mäuse bzw. bei intraembryonalen Transplantationen in Mäuse und Ratten (Povlsen et al., 1975) kam es immer wieder neben stets gleichbleibenden histologischen Charakteristika zu aggressiverem Wachstum, vermehrter Metastasenbildung

im Wirtstier. Als Ursache wurden Virusinfektionen des Tumors sowie Hybridisierung der Tumor- und Stromazellen angenommen (Visfeldt et al., 1972). Deshalb war die Untersuchung der Nacktmauspässagen von eminentem Interesse (Goldenberg et al., 1974, Huebner et al., 1979, Lampert et al., 1968, Popescu et al., 1970).

1969 wurde der erste menschliche Tumor auf eine Nacktmaus transplantiert. Dabei wies die durchgeführte histologische Untersuchung eine völlige Übereinstimmung mit dem Ursprungstumor auf (Rygaard et al., 1969). Visfeldt führte Chromosomenanalysen von Kolonadenokarzinomen und Melanommetastasen durch, die auf Nacktmäuse transplantiert worden waren. In allen von diesen Tumoren gewonnenen Präparaten wurden nur Mitosen menschlichen Ursprungs nachgewiesen. Auch die Histologie des Xenotransplantats entsprach dem Patiententumor. Eine fortgesetzte Passagierung des Tumors wurde nicht durchgeführt (Visfeldt et al., 1972).

Einige Jahre später fanden Untersuchungen von Tumoren statt, die bis zu 56 mal passagiert wurden (Sordat et al., 1974, Povlsen et al., 1975). Bei keinem der Tumoren (2 Kolonadenokarzinome, 2 Melanome und 1 Burkitt Lymphom) konnte eine Chromosomenabweichung vom menschlichen Karyotyp oder eine Änderung der ursprünglichen Morphologie nachgewiesen werden. Auch bei Mamma- und Pankreaskarzinomen gelang kein Nachweis einer Hybridisierung oder dem Auftreten einer vom Ausgangstumor abweichenden Histologie. Auch andere wichtige Charakteristika der Patiententumoren blieben bestehen, wie z.B. Mucin- und CEA-Produktion bei Kolonkarzinomen oder HCG-Produktion bei Hodenkarzinomen (Wirth et al., 1981, Povlsen, 1981).

Es gab aber bereits erste Hinweise auf Entdifferenzierungssymptome während der ersten Passagen, bei denen jedoch die morphologischen und biochemischen Hauptmerkmale erhalten blieben (Reid et al., 1978, Hajdu et al., 1978).

Dagegen beobachtete Sharkey et al. 1978 eine Zunahme der Parenchymdifferenzierung über mehrere Passagen hinweg, besonders bei ursprünglich wenig ausdifferenzierten Tumoren. Dies führte zu der Idee, durch das Passagieren schlecht ausdifferenzierter Geschwülste auf Nackmäusen, die Exaktheit der pathologischen Diagnose zu erhöhen. Wurden jedoch etablierte Zelllinien auf Nacktmäuse übertragen, konnten im Gegensatz zur Transplantation des Patientenmaterials nur geringfügige histologische Abweichungen festgestellt werden (Fogh et al., 1978).

Es zeigte sich, daß der Transplantationsort nicht nur Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit, sondern auch auf den Grad der Ausdifferenzierung der Transplantate besitzt. Der Nachweis gelang, indem suspendierte Sarkomzellen einer Versuchsgruppe intraperitoneal und einer anderen subkutan appliziert wurden. Intraperitoneal injizierte Zellen wuchsen langsamer und zu weniger ausdifferenzierten Tumoren als die subcutan applizierten heran (Hajdu et al., 1981, Sharkey et al., 1985).

Mit Ausnahme der erwähnten geringfügigen Veränderungen wurden die transplantierten Tumoren während ihrer Passagen von den verschiedenen Autoren als stabil betrachtet.

Es liegen aber auch Berichte vor, in denen auf größere Veränderungen innerhalb mehrerer Passagen hingewiesen wird. 1905/1906 berichtete Paul Ehrlich über eine Geschwulst, die aus "epithelialen Zellnestern und verschieden stark ausgebildeten bindegewebigen Gerüst" bestand. Nach der

10. Generation entwickelte sie sich zu einem Misch tumor, wobei "die außerordentlich spärlichen Krebsnester durch breite Straßen eines sich aus grossen spindligen Zellen zusammengesetzten Gewebes getrennt sind, in denen ein ganz ungewöhnlicher Reichtum an Mitosen zu konstatieren ist." (Ehrlich, 1905, Ehrlich et al., 1906).

In jüngster Zeit gelang es, die Entwicklung eines murinen Fibrosarkoms innerhalb eines xenotransplantierten, menschlichen Karzinoms auf der Nacktmaus bis zum Ablauf der 20. Passage nachzuweisen. Bei der Verimpfung etablierter Zelllinien auf Nackmäuse war dieses Phänomen nicht wiederholbar. Die "krebsfördernde" Wirkung auf das murine Stroma schien nur bei sofortiger Transplantation des Patiententmaterials auf die Versuchstiere aufzutreten, jedoch nicht, wenn eine vorangegangene Zellkultivierung des Tumors stattgefunden hat (Goldenberg et al., 1980). Dieser Befund fand durch eine Beobachtung von Fogh insofern eine Bestätigung, als durch eine abwechselnde Kultivierung etablierter Melanomzellkultur in vivo und in vitro es weder zu einer Veränderung bestimmter Eigenschaften kam, noch die Induktion eines neuen Tumortyps beobachtet wurde (Fogh et al., 1978).

Im Gegensatz dazu stand jedoch die Feststellung von Huebner et al. 1979, daß humane Sarkomzellen, die in vitro 5-30 Passagen kultiviert und dann auf immunsupprimierte Ratten übertragen wurden, in vivo erst nach 5-10 Passagen zu Sarkomen führten, die mit Hilfe der Chromosomenanalyse als Rattenneoplasien erkannt wurden. Dagegen entstand aus humanen Sarkomzellen, die bereits mehr als 150 mal in vitro passagiert wurden schon binnen 2-3 Tierpassagen ein solides Rattensarkom.

Die durch die transplantierten menschlichen Karzinome auf Nacktmäuse verursachte Entartung des murinen, versorgenden Stromas konnte durch weitere Versuche bestätigt werden. Ein nach der 3. Wirtspassage für 4 Jahre eingefrorenes

muzinproduzierendes Zystadenocarcinom wurde wieder aufgetaut und retransplantiert. Dabei konnte von Goldenberg und Pavia 1981 während der folgenden Passagen eine Regression des Parenchyms und eine progressive Kanzerisierung der mesenchymalen Anteile beobachtet werden.

Auch durch die Diskrepanz zwischen Tumorgröße und Höhe der Tumormarkerproduktion (z.B.: CEA) konnte ein indirekter Schluß auf Bindegewebiszunahme innerhalb einer Geschwulst gezogen werden. Die aus diesem Tumor gewonnenen transformierten, murinen Fibroblasten wuchsen in Nacktmäusen zu Fibroblastentumoren heran (Staab et al., 1983).

4. Ablauf des Wachstums neoplastischer Xenotransplantate auf der Nacktmaus

Direkt nach der Transplantation von Tumorgewebe geht bereits ein großer Teil der Zellen zugrunde. Zu diesem untergehenden Gewebe gehören nicht nur viele Tumorzellen sondern insbesondere auch die Gesamtheit der übertragenen Blutgefäße (Endothelzellen). Bei der Übertragung vom embryonalen Gewebe dagegen bleibt das Endothel bestehen und findet später den Anschluß an das neue Blutgefäßsystem.

Im allgemeinen bilden die überlebenden Tumorzellen kleine, maximal aus 1 Million Zellen bestehende Knötchen mit 1-2 mm Durchmesser, welche nur durch Diffusion mit den benötigten Nährstoffen versorgt werden. Ab Erreichen dieser Größe vermehren sich nur noch Zellen an der Tumorperipherie, während die zentral gelegenen Zellen nekrotisch werden. Dieses Stadium kann längere Zeit bestehen bleiben, zum Beispiel an der Chorioallantoismembran (CAM) zwei Tage oder an der Kornea zwei Monate.

Während dieses Stadiums setzt die Produktion des "tissue angiogenesis factor" (TAF = Gewebsangiogenesefaktor) ein. Seine Gegenwart läßt sich nachweisen, indem implantierte Tumoren auch nach der Trennung vom Wirtsstroma mittels eines Milliporfilters in diesem eine Blutgefäßneubildung induzieren.

Durch die Migration und Vermehrung der Wirtsendothelzellen und durch das im Tumor enthaltene Heparin, das von den im Tumor angereicherten wirtseigenen Mastzellen abgegeben wird, kommt es zum Anschluß der Tumorknötchen an das Blutgefäßsystem. Nach erfolgtem Blutgefäßanschluß setzt ein rasches Wachstum des Tumors ein, verbunden mit einer andauernden Kapillarneubildung (Abb. 1).

Ab einem Volumen von ca. 1 cm^3 treten wieder zentral-nekrotische Erscheinungen auf. Ursache ist der durch das Wachstum sich im Zentrum immer weiter erhöhende Gewebsdruck, der zur Komprimierung der Kapillaren führt. Damit ist eine ausreichende Blutversorgung der zentralen Bereiche nicht mehr gewährleistet.

Ein gravierender Unterschied zwischen dem Patiententumor und dem Versuchstierimplantat wird dadurch deutlich, daß selbst die im Spender noch infiltrativ wachsende Tumoren in der Nacktmaus von einer Stromakapsel unterschiedlicher Dicke umgeben werden, so daß eine Infiltration der Unterlage nur selten auftritt. Darüber hinaus wird die Bildung von Metastasen selten beobachtet. Dieser Befund wird auf die Wirkung der NK-Zellen zurückgeführt (Gross et al., 1986, Auerbach et al., 1979, Folkman 1971, Folkman et al., 1976, Forthmeyer, 1981, Gimbrone et al. 1974, Greenblatt et al., 1968, Kessler et al., 1976, Roch et al., 1985, Sidky et al., 1975, Stewart et al., 1984).

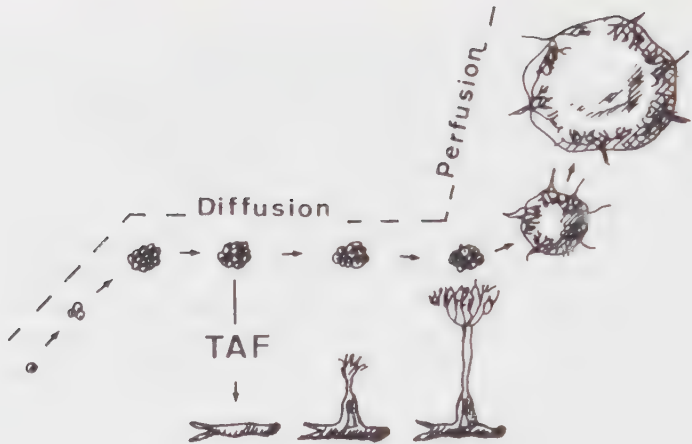


Abb. 1: Tumoranschluß an das Blutgefäßsystem des Wirtes
(nach Folkman 1971)

5. Immunhistochemie

5.1. Prinzip

Die Immunhistochemie als Zweig der Histochemie nutzt die Fähigkeit des Organismus gegen die als fremd erkannten Antigene, spezifische Antikörper zu bilden. Die hochspezifische Antigen-Antikörper Reaktion führt zur Bildung von Immunkomplexen, welche jedoch nicht direkt mikroskopisch nachweisbar sind. Es besteht aber die Möglichkeit, die Antikörper ohne Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit mit Substanzen zu koppeln, die es ermöglichen, den entstandenen Immunkomplex sichtbar zu machen.

Die Koppelung des Antikörpers mit Fluoreszenzfarbstoffen (Coons, 1956) brachte erste Resultate über die Antigenverteilung auf Gewebsschnitten. Nachteile der Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Fluorosceinisoithiocyanat oder Rhodamin ist das Ausblassen der Färbung nach einigen Wochen.

Weiterhin muß ein Dunkelfeld/Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung stehen.

Da diese Nachteile bei der Immunenzymhistochemie nicht auftreten, wurden deren Vorteile rasch erkannt, besonders seit der Einführung der Meerrettich-Peroxidase (Nakane, 1967, Nakane, 1974, Burns et al., 1974).

Es werden auch andere, nicht so verbreitete Enzyme eingesetzt, wie: saure Phosphatase (Nakane 1967), alkalische Phosphatase (in letzter Zeit immer häufiger bei Blutausschichtuntersuchungen verwendet) (Nakane, 1967), Glukose-Oxidase (Avrameas, 1969, Clark et al., 1982), β -Galaktosidase und Cytochrom C.

Entsprechend der Vielzahl der Enzyme können diese mit verschiedenen Substraten (als Elektronendonatoren) farbig unterschiedlich dargestellt werden (Karnovsky et al., 1965).

Die Tabelle vermittelt einen Überblick über die möglichen Substrate der Meerrettich-Peroxidase und die Farben der Reaktionsprodukte:

Bezeichnung	Abkürzung	Farbe
Diaminobenzidin	DAB	braun
3-amino-9-ethyl carbazol	AEC	rotbraun
4-Chlor-1-naphtol	4-CN	blau
2,2' Azino-di[3 ethyl benzthiazolin sulphonic azid(6)]	ABTS	grün
ortho-Phenyldiamin	OPD	braun
3,3',5,5' Tetramethyl benzidin	TMB	blau/gelb

5.2. Methoden

Die Spezifität der immunhistochemischen Methode hat sich seit Einführung monoklonaler Antikörper (Köhler, Milstein, 1975) wesentlich verbessert. Um für eine niedrige Antigen-dichte ein besonders empfindliches Verfahren zu besitzen, werden verschiedene Methoden, je nach Zweckmäßigkeit, angewendet.

Direkte Methode:

Der auf den Schnitt aufgetragene gegen ein bestimmtes Antigen gerichtete Antikörper (Y) ist bereits mit Enzym-/Fluoreszenzfarbstoff (●) gekoppelt und wird durch Auftragen des entsprechenden Farbsubstrats sichtbar gemacht (Nakane, 1967)(Abb. 2a).

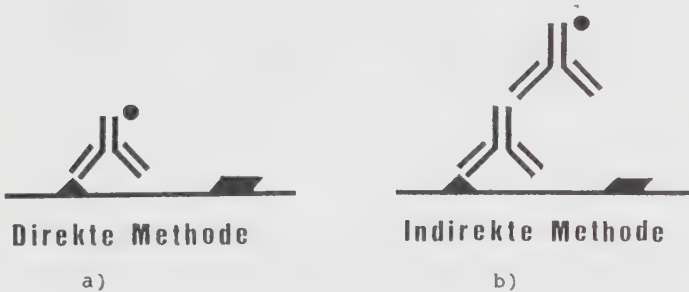


Abb. 2: Immunhistochemische Methoden

Indirekte Methode:

Der erste Antikörper (Y) ist spezifisch gegen das Gewebsantigen (▲) gerichtet, der zweite Antikörper, ein Immunglobulin aus einer anderen Spezies, mit einem Enzym-/Fluoreszenzfarbstoff (●) gekoppelt, ist gegen den ersten Antikörper gerichtet. Die Empfindlichkeit wird auf diese Weise erhöht und darüber hinaus kann ein und derselbe markierte zweite Antikörper bei mehreren Primärantikörpern benutzt werden (DeLellis et al., 1979, Farr et al., 1981, Bosmann et al., 1983)(Abb. 2b).

Enzym - Brücken - Methode (Enzyme Bridge Method):

Nach dem Auftragen des ersten Antikörpers (A) () wird ein dagegen gerichtetes zweites Immunglobulin () von einer anderen Spezies aufgetragen. Danach folgt ein spezifisches Antiserum () aus der selben Spezies wie (A), welches gegen das aufzutragende Enzym gerichtet ist. Als letztes wird der Schnitt mit dem Enzym () sowie dem Substrat inkubiert. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist bei großem Zeitaufwand sehr hoch (Mason et al., 1969, Avrameas, 1969) (Abb. 3a).

Hybridantikörper - Methode:

Ein Antikörper, gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet, wird enzymatisch gespalten und nach Zugabe eines gleichermaßen gespaltenen, gegen die Meerettich-Peroxidase gerichteten Antikörpers (aus der selben Spezies) wieder zusammengesetzt (). Nach mehreren Reinigungsschritten bleiben theoretisch nur divalente Antikörper übrig, d.h. solche, die sowohl gegen das Enzym, als auch gegen das gesuchte Antigen gerichtet sind. Durch die Verunreinigung mit monovalenten Antikörpern ist die Empfindlichkeit etwas reduziert (Avrameas, 1969, Sternberger, 1979) (Abb. 3b).

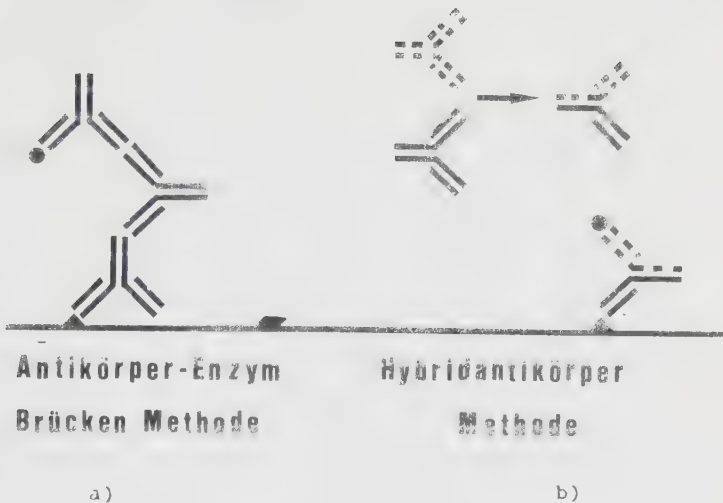


Abb. 3: Immunhistochemische Methoden

PAP - Methode:

Die von Sternberger entwickelte Methode gilt als Alternative zu den mit Enzym/Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörpern bei gleichzeitiger Erhöhung der Sensibilität. Diese wird jedoch durch eine zu starke Verdünnung des ersten Antikörpers wieder verringert. Der PAP-Komplex selbst besteht aus einem gegen Meerrettich-Peroxidase gerichteten Kaninchenantikörper und einem Meerrettich-Peroxidase-Antigen () . Nach Auftragen des Kaninchenantikörpers () gegen das gesuchte Gewebsantigen wird der zweite Antikörper (in der Regel ein Anti-Kaninchen Immunglobulin vom Schwein) im Überschuß aufgetragen. Als letztes folgt der PAP-Komplex. Der Vorteil besteht darin, daß die Antikörper aufgrund der fehlenden Enzymkonjugation ihre

volle Antigenaffinität und -spezifität behalten
(Sternberger, Immunocytochemistry 1979)(Abb. 4).

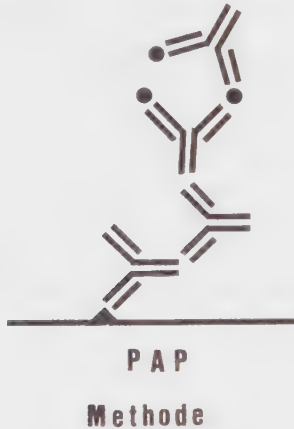


Abb. 4: Immunhistochemische Methoden

5.3. Aussagefähigkeit

Um eine Färbung korrekt bewerten zu können, muß die Schnittbehandlung standardisiert werden. Weiterhin muß die Möglichkeit bestehen, sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse zu erkennen.

Antikörper reagieren in verschiedenen Testsystemen (RIA, ELISA, Elektrophorese, Immunperoxidase) mit ihren Antigenen verschieden stark (Hajmannet al., 1984).

Eine große Rolle spielt bei der späteren Gewebsbeurteilung auch die Art der Fixierung des histologischen Präparates.

Bei der Fixierung des gesamten Gewebes mit Formalin, Zenkers Fixativ oder nach Bouin (Picrinsäure) kann es zur

Maskierung einiger Antigene kommen. Durch nachfolgende Behandlung mit Trypsin, Pepsin, Papain oder Pronase ist eine Demaskierung möglich. Andere Antigene können jedoch durch bestimmte Fixative irreversibel zerstört werden (Curran et al., 1978). Durch Schockgefrieren des Gewebes in Flüssigstickstoff und Fixierung der einzelnen Schnitte mit Aceton oder Aceton-Äthanol kann dies verhindert werden (Judd et al., 1982, LeLellis et al., 1979, Lewis et al., 1983). Andere Autoren empfehlen die Fixierung dem gesuchten Antikörper anzupassen (Lewis et al., 1983).

Auf das Mitführen von Kontrollobjektträgern während des Färbevorganges sollte nicht verzichtet werden, um später bei der Auswertung eine positive Hintergrundreaktion. Kreuzreaktionen des zweiten Antikörpers oder Reaktionen der endogenen Peroxidase berücksichtigen zu können. Verschiedene Antikörperverdünnungsstufen müssen geprüft werden, um ein optimales Verhältnis zwischen positiver Färbung und Hintergrundreaktion zu erhalten (Taylor 1978).

6. Bisbenzimidanwendung

Bisbenzimid/33258 Hoechst Fluorochrom (2-(2-(4-hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl)-6-(1 methyl-4-piperazyl)-benzimidazol-trihydrochlorid) kann nicht nur zum Mykoplasmenachweis in Zellkulturen (Cherr et al., 1977), sondern auch in der Histologie eingesetzt werden. Mit Hilfe dieses DNS-spezifischen Fluorochroms besteht die Möglichkeit auf Grund einer Heterochromatinderstellung Interphasenkerne zu differenzieren. Murine, mit Bisbenzimid gefärbte Chromosomen zeigen intensiv fluoreszierende Banden in der Zentromerregion im Gegensatz zu Chromosomen anderer Spezies, die eine uniforme Anfärbbarkeit zeigen. (Cunha et al., 1984).

Auf diese Weise können bei Xenotransplantaten auf Mäusen die Transplantatsgrenzen deutlich bestimmt werden (Müller, 1976, Graem et al., 1984). Auch bei interspezifischen Fusionsversuchen erübrigt sich aufgrund dieser Eigenschaft eine Vorbehandlung des einen Elternteils mit (H_3) Thymidin für spätere Speziesdifferenzierung des Kernes mit Hilfe der Autoradiographie (Moser et al., 1975).

In der experimentellen Onkologie wird Bisbenzimid ebenfalls zur Speziesunterscheidung verwendet. Graem transplantierte menschliche Haut auf Nacktmäuse und behandelte diese mit DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) und TPA (12-O-tetradecanoylphorboll3-acetat). Auf dem transplantierten Gewebe entwickelten sich jedoch keine Tumoren. Diese entstanden nur entlang der Grenze zwischen dem humanen und murinen Gewebe. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes war es möglich, das neoplastische Gewebe eindeutig der murinen Epidermis zuzuordnen (Graem, 1986).

7. Radioimmunszintigraphie:

Antikörper als Träger der Immunität im Serum wurden bereits 1890 das erstemal beschrieben. Konsequenterweise wurden bald darauf Seren immunisierter Tiere zur Therapie von Infektionskrankheiten oder Tumoren eingesetzt (Richtet, 1895, Duran, 1939).

Die Grundvoraussetzung für die Anwendung isotonenmarkierter Antikörper in der Diagnostik wurde Ende der vierziger Jahre geschaffen. Pressman beschrieb die radioaktive Markierung von Antikörpern gegen Mausnierengewebe mit I^{131} , wobei das Bindungsvermögen erhalten blieb und eine spezifische Anreicherung der Antikörper im entsprechenden Gewebe erfolgte. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte in

tierexperimentellen Studien mit einem spezifischen I 131-markierten Antilymphom Antikörper Lymphosarkome immunszintigraphisch darstellen.

Eine Antikörperanreicherung im Tumor wird nicht nur durch die Präsenz spezifischer Antigene bedingt, sondern oft durch Fibrin verursacht wird, welches sich aufgrund unterschiedlicher Vorgänge im Tumor anreichert. Aufgrund dieser Erkenntnis setzten Spar et al. 1959 I 131-markierte Antifibrin-Antikörper ein, jedoch ohne den erhofften Erfolg zu erzielen.

Die Einführung der Doppelisotopen-Technik erlaubte durch die die Anwendung zweier verschiedener Isotope (z.B. Pressman 1957; I 131/I 125) eine Darstellung der Tumoraktivität getrennt von der unspezifischen Hintergrundaktivität. Denn mit Hilfe der Zwei-Kanal-Szintigraphie und eines zweiten unspezifischen mit einem anderen Isotop markierten Antikörpers konnte die durchblutungsbedingte Radioaktivität vom Bild des spezifischen Antikörpers abgezogen wurden (Pressman, 1957). Das Computer-Substraktionsverfahren wurde weiter ausgebaut mit Tc 99m-markierten Albumin und Tc 99m-Pertechnetat zur Darstellung der intra- bzw. extravasalen Aktivität. Die auf diese Art ermittelte Hintergrundaktivität wurde von der Aktivitätsverteilung der radioaktiv markierten spezifischen Antikörper abgezogen. Mehr als 70% aller Tumoren konnten auf diese Weise dargestellt werden (DeLand et al., 1980). Eine Verwendung anderer Isotope für die Antikörpermarkierung ist ebenfalls möglich (Ballou et al., 1979).

Die Entdeckung der sogenannten "tumorassoziierten Antigene", besonders des Karzinoembryonalen Antigens (CEA) (Denk et al., 1972, Gold et al., 1965) bedeutete für die

Immunszintigraphie einen großen Fortschritt. Das CEA ist ein von Gastrointestinaltumoren verstärkt exprimiertes Antigen, welches auch in die Blutbahn abgegeben wird. Die szintigraphische Darstellung von CEA produzierenden Tumoren erfolgte einige Jahre später mit Hilfe von Isotopen markierten polyklonalen CEA-Antikörpern (Goldenberg et al., 1974, Goldenberg et al., 1983, Mach et al., 1981, Mach et al., 1983). Mit polyklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte andere Tumormarker wie HCG (Begent et al. 1980, Quinones et al., 1970) oder alpha-Fetoprotein (Kim et al., 1980) gerichtet waren, konnten Tumoren wie Hoden- oder Ovarialkarzinome erfolgreich dargestellt werden.

Erst seit Einführung der Hybridomtechnologie (Köhler, Milstein, 1975) boten sich hochspezifische monoklonale Antikörper (MAK) gegen tumorassoziierte Antigene an, die mit verschiedenen Isotopen markiert, in der Tumordiagnostik erfolgreich eingesetzt werden konnten. Innerhalb kürzester Zeit wurden monoklonale Antikörper (MAK) gegen unterschiedliche Tumorantigene entwickelt. Bei Mammakarzinomen wurden MAK gegen menschliche Milchfett-Globuline bzw. gegen das Mammakarzinomgewebe selbst entwickelt und in der Immunszintigraphischen Diagnostik eingesetzt (Khaw et al., 1981, Rainsbury et al., 1984, Taylor-Papadimitriou et al., 1981). ¹²⁵I- bzw. ¹³¹I-markierte MAK wurden in der Diagnostik von Ovarialkarzinomen verwendet (Granowska et al., 1984). Auch gegen Gastrointestinalkarzinome, wie z.B. gegen das Kolonkarzinom konnten eine Reihe von monoklonalen Antikörpern entwickelt und mit Erfolg Immunszintigraphisch eingesetzt werden (Chatal et al., Koprowski et al., 1979, Mach et al., 1983).

Die Erwartung, daß man mit der Hybridomtechnik spezifische, gegen einen bestimmten Tumortyp gerichtete Antikörper erhalten könnte, hat sich bisher nicht erfüllt.

Bei der Entwicklung und dem Einsatz von Antikörpern in der immunszintigraphischen Diagnostik müssen unterschiedliche Parameter berücksichtigt werden, um eine gute szintigraphische Darstellung der Tumoren zu erhalten.

Der MAK sollte an ein Antigen binden, welches im Tumorgewebe möglichst homogen und in hoher Dichte exprimiert ist. Die Affinität dieses Antikörpers zu seinem Antigen sollte über 10^{10} Mol/l liegen. Die Kreuzreaktivität mit dem Normalgewebe sollte so niedrig wie möglich sein. Wichtig für die Darstellung des Tumors ist ebenfalls die Bioverfügbarkeit des MAK. Diese ist abhängig von der Vaskularisation und dem Nekrotisierungsgrad des Tumors. Durch bestimmte vom Tumor in die Blutbahn abgegebene tumorassoziierte Antigene kommt es nach einer Applikation markierter Antikörper oft zu hohen Konzentrationen an Immunkomplexen. Ihr Einfluß auf die szintigraphische Darstellung wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich beurteilt (Dillman et al., 1984, Goldenberg et al., 1978).

Um rasch hohe Tumor/Blut Quotienten zu erhalten bietet sich die Anwendung von bivalenten $F(ab')_2$ (100 000 Dalton) oder monovalenten Fab-Fragmenten (30 000 Dalton) an, da die Plasmahalbwertszeit besonders durch das Fc-Fragment des intakten MAK (150 000 Dalton) bestimmt wird. Der Nachteil der Fragmente ist jedoch eine geringere Bindungsstärke an das Antigen. Deshalb muß je nach angestrebten Ziel bei jedem Antigen-Antikörpersystem eine individuelle Entscheidung getroffen werden (Senekowitsch et al., 1985, Senekowitsch et al., 1987).

Um der Heterogenität der Antigenexpression im Tumor gerecht zu werden, wurden in jünster Zeit Untersuchungen mit MAK "Cocktails" durchgeführt, wobei diese gegen unterschiedliche Antigendeterminanten gerichtet waren (Larson et al., 1985).

Die Art der Antikörperverabreichung (intraarteriell, intravenös, intralymphatisch oder intraperitoneal) scheint ebenfalls einen Einfluß auf die Anreicherung der markierten MAK im Tumor zu besitzen (Winkler, 1985).

Weiterhin müssen die Strahlungseigenschaften des verwendeten Nuklids, dessen Wirkung auf die Immunreaktivität des MAK und die Stabilität der Markierung berücksichtigt werden (Keenan et al., 1985).

Für die Erforschung und Verbesserung der erwähnten Parameter stellt die Nacktmaus ein ideales Versuchsmodell dar, da ein laufend passagierter Tumor wiederholt szintigraphisch dargestellt werden kann unter Berücksichtigung der Bioverfügbarkeit des jeweiligen isotonenmarkierten Antikörpers (Senekowitsch et al., 1987 in press).

Aus dem bisher Genannten ergibt sich die Notwendigkeit, einen Vergleich der Tumorphistologie mit der immunszintigraphischen Darstellung nicht nur im Hinblick auf die Antikörperspezifität und Größe des Tumors durchzuführen (Biersack et al., Chatal et al., 1984). Es sollten auch Veränderung der Tumormorphologie oder des Parenchym-Stroma Verhältnisses und der Vaskularisation des Tumors während seiner Passagierung in der Nacktmaus im Hinblick auf die Biokinetik und die immunszintigraphische Darstellung mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern verglichen werden.

C. PROBLEMSTELLUNG

Xenotransplantierte humane Karzinome werden während ihres Wachstums auf der Nacktmaus von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Diese Einflüsse können Auswirkungen auf die Entwicklung der Tumormorphologie besitzen.

Um eventuelle Veränderungen innerhalb des xenotransplantierten Tumors zu erkennen, ist es notwendig, sich mit Methoden zu beschäftigen, mit deren Hilfe eine Unterscheidung zwischen humanen Tumorparenchym und murinen Stroma in histologischen Schnitten ermöglicht wird.

In der Vergangenheit waren bereits mehrere experimentelle Ansätze zu verzeichnen, mit deren Hilfe eine genaue zwischenartliche Unterscheidung auf histologischen Präparaten ermöglicht wurde.

- Das Blutgruppenantigen B konnte, dank seiner unterschiedlichen Expression auf humaner und muriner Epidermis, zur Speziesdifferenzierung herangezogen werden (Graem et al., 1984).

- Mit dem Heterochromatinfarbstoff Bisbenzimid (Höchst 33258) war eine Unterscheidung humaner und muriner Nuklei möglich, wobei sich die Nuklei murinen Ursprungs mit stark fluoreszierenden Granula darstellten (Graem et al., 1986, Moser et al., 1975, Müller, 1976).

- Mit Hilfe polyklonaler Anti-Maus/ Anti-Mensch Antikörper gelang eine Trennung von Stroma und Parenchym von humanen Tumoren, die auf thymektomierte Mäuse transplantiert wurden. Jedoch war die Aussagekraft durch die Anwendung der Fluoreszenzmarkierung deutlich eingeschränkt. Die Anwendung handelsüblicher polyklonaler Antikörper barg weiterhin die Gefahr von Kreuzreaktionen (Warenius, 1980).

Die genannten Lösungen waren rein auf das Problem Mensch-Maus Unterscheidung zugeschnitten und nicht

allgemein anwendbar. Zudem sind durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen auf längere Dauer ausgelegte Versuche kaum durchführbar, da die Präparate rasch Fluoreszenzintensität verlieren.

In dieser Arbeit werden zwei immunhistochemische Methoden vorgestellt, die nicht nur dank der Enzymkonjugation zu langfristig auswertbaren Ergebnissen, sondern auch kaum zu zwischenartlichen Kreuzreaktionen führen.

Als erstes wird eine direkte Methode mit einem spezies-spezifisch gereinigten polyklonalen Antikörper vorgestellt, welcher gegen murines bzw. gegen humanes Immunglobulin G (Anti-Maus IgG bzw. Anti-Mensch IgG) gerichtet ist. Als zweite Methode wird die Anwendung eines monoklonalen HLA-Antikörpers aus einer Ratte-Maus Fusion beschrieben.

Zusätzlich wird die Bisbenzimidfärbung zur Heterochromatindarstellung verwendet.

Die beiden ersten Methoden erlauben es nun über mehrere Passagen hinweg all diejenigen Veränderungen der Morphologie wahrzunehmen, welche mit einer unverhältnismäßigen Verschiebung des Verhältnisses Parenchym-Stroma einhergehen und eine eventuelle Stromamalignisierung beinhalten können.

Diese routinemäßig und für jede Spezies mit entsprechenden Antikörper durchführbaren Methoden eröffnen die Möglichkeit, die Ergebnisse der Diagnostik und Therapie mit der Tumorgewebspathohistologie in Beziehung zu setzen.

Weiterhin wurde versucht, die Biokinetik und Tumoranreicherung von ^{131}I -markierten Antikörpern und somit die immunszintigraphische Darstellbarkeit von Antikörpern mit der Tumorphistologie zu korrelieren.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. MATERIAL UND METHODEN

1.1. Versuchstiere

Es wurden ca. 6 Wochen alte Balb/c-nu/nu Mäuse beiderlei Geschlechtes in den Versuchen eingesetzt. Zur Transplantation des Hodenkarzinoms wurden nur männliche Tiere verwendet.

In der Zucht wurden homozygote Männchen mit heterozygoten Weibchen gepaart um relativ konstante Aufzuchtergebnisse zu gewährleisten. Im Alter von ca. 2 Wochen erfolgte aufgrund unterschiedlicher Fibrissenform die Trennung homo- und heterozygoter Jungtiere. Die Tiere lebten während der ganzen Zeit unter keimreduzierten Bedingungen (laminar air-flow) in Makrolonkäfigen mit sterilisierter Einstreu. Die Raumtemperatur betrug 28 °C, die Luftfeuchtigkeit 50%-60%. Die Tiere erhielten sterilisierte Altromin^(R) Standard Diät 1320 und angesäuertes Trinkwasser (pH 2,5) ad libitum.

1.2. Tumoren

Die für die Transplantation vorgesehenen humanen Tumoren wurden direkt nach der operativen Entfernung in ein Nährmedium gelegt (Earle's MEM, serumfrei, Sero-med^(R)), eiskühlt transportiert und spätestens nach 2 Stunden transplantiert.

1.2.1. Hodenkarzinom (HoCa 5)

Pathologischer Befund:

Das Tumorgewebe besteht aus hochgradig atypischem Epithel mit mittelgroßen Kernen. Es liegt in soliden Verbänden vor, mit stellenweise drüsigen und papillären Formationen. Es enthält HCG-positive Riesenzellen.

1.2.2. Kolonkarzinom (ColCa 1)

Pathologischer Befund:

Es handelt sich um ein gut aussdifferenziertes, schleimbildendes Adenokarzinom mit Infiltration aller Wandschichten sowie des angrenzenden Fettgewebes. Lymphknotenmetastasen wurden nicht nachgewiesen.

1.2.3. Magenkarzinom (MagCa 1)

Pathologischer Befund:

Ausgedehntes ulzeriertes, schleimbildendes Adenokarzinom des Magenfundus mit überwiegend undifferenzierten Anteilen. Infiltration sämtlicher Magenwandschichten und des Fettgewebes der kleinen Kurvatur.

1.2.4. Mammakarzinom (Maca F)

Etablierte Tumورlinie von Prof. Forthmeyer (Klinikum der Universität Frankfurt) am 31.10.85 in der 28. Passage freundlicherweise der Abteilung für Nuklearbiologie zur Verfügung gestellt.

1.3. Behandlung der Tumoren

1.3.1. Transplantation

Die Tumoren wurden in einer Antibiotikallösung (Penicillin/Streptomycin) kurz gespült. Danach wurde das Binde- und Fettgewebe entfernt. Das Gewebe wurde in steriler Ringerlösung in 2 x 2 mm große Teile zerlegt. Die folgende Transplantation fand weiterhin unter sterilen Bedingungen statt:

Die ausgewählten Tiere wurden mit Äther betäubt.

1-1,5 cm kaudal des linken Schulterblattes erfolgte ein 0,5 cm langer Einschnitt. Von diesem aus wurde nach ventral eine kleine subkutane Tasche gebildet, in welcher das zu transplantierende Gewebe deponiert wurde. Die Schnittflächen wurden mit einem Gewebekleber (Histoacryl^(R) blau, B.Braun Melsungen AG) verschlossen. Der nach einigen Wochen herangewachsene Tumor wurde in gleicher Art weitertransplantiert (passagiert).

Die Tumorgenerationen wurden wie folgt bezeichnet:

- Patiententumor: Operativ gewonnenes, menschliches Tumorgewebe
- Ausgangstumor: Der in der Maus erfolgreich angewachsene Patiententumor
- 1. Passage: Der transplantierte und herangewachsene Ausgangstumor
- ab diesem Zeitpunkt erfolgt eine Durchnummerierung der einzelnen Passagen.

1.3.2. Einfrieren des Operationsmaterials und der passagierten Tumoren

Schockgefrieren für immunhistochemische Untersuchungen:

Sowohl das nicht transplantierte Tumormaterial als auch die folgenden Passagen (Durchmesser ca. 0,5 cm nach 4-8 Wochen) wurden, sofern sie nicht sofort benötigt wurden, auf folgende Weise eingefroren:

Das Tier wurde abgetötet und der Tumor aus der subkutanen Tasche entnommen. Dann wurde der Tumor je nach Größe des Materials geteilt, die Gewebesteile mit einem Einbettungsmedium (Tissue Tek O.C.T. Compound, Miles Lab.) bestrichen und im in Flüssigstickstoff vorgekühltem Isopentan (Merck^(R)) schockgefroren. Eine endgültige Lagerung in Flüssigstickstoff erfolgte in Cryotubes (Nunc^(R))

Alle genannten Tumoren wurden auf diese Weise bis zu ihrer 4.-5. Passage behandelt.

Fraktioniertes Einfrieren zur Konservierung des vitalen Materials für spätere Transplantationen:

Der Tumor wurde zerkleinert, in Cryotubes gefüllt und das Einfrieremedium (10% DMSO, 90% FKS) hinzugefügt. Am ersten Tag erfolgte das Einfrieren in einer Styroporummhüllung (Gewährleistung eines niedrigen Gefriergradienten) in einem Gefriersystem mit der konstanten Temperatur von -70 °C. Nach 24 Stunden begann die endgültige Lagerung in Flüssigstickstoff bei -196 °C.

Bei diesem Verfahren blieb die Lebensfähigkeit der Zellen zwar erhalten, eine Verwendung für histologische Zwecke war aber nicht mehr möglich.

Auf diese Weise wurde nur der Patiententumor eingefroren.

1.4. Histologische Methoden

1.4.1. Allgemeines

Vorbereiten der Objektträger:

Um eine bessere Haftung der Schnitte während der Färbepériode zu erreichen, wurden die Objektträger mit einer Chrom-Alaun Gelatinelsg. beschichtet und staubfrei getrocknet (Kaliumchrom (III) Sulfat zur Analyse, (Merck^(R)); Gelatine (Schweinehaut) Typ I (Sigma^(R))).

Um mehrere Schnitte auf einem Objektträger gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen färben zu können, erfolgt eine Unterteilung der Objektträgeroberfläche mittels Schablone und Übersprühen mit Teflonspray (Du Pont^(R)).

Schneiden und fixieren:

Das schockgefrorene Gewebe wurde im Frigocut 2700 (Reichert-Jung) bei -15 bis -20 °C (Schnittdicke 5-7 µm) geschnitten. Anschließend erfolgte die Fixation der Schnitte im Azetatpuffer (10 sec).

Einfrieren und Auftauen der Schnitte:

Die Schnitte wurden bei -20 bis -25 °C in luftdicht abgeschlossenen Kunststoffboxen mit Blaugel (Merck^(R)) als Trocknungsmittel aufbewahrt. Auf diese Weise war eine mehrwöchige Haltbarkeit gewährleistet. Vor dem Färben wurden sie entnommen und in 5 bis 8 °C kalten Azeton 10 min fixiert (Judd et al., 1982).

Gegenfärbungen:

Da 3-AEC-Lsg. als Farbsubstrat diente, sollten zur Gegenfärbung nur alkoholfreie Farbstoffe benutzt werden. Folgende drei Färbeverfahren wurden angewendet:

- Mayers Hämalan (Merck^(R))

Die Färbedauer betrug 5 min. Es wurde in 70 ml Aqua dest. mit 3-4 Tropfen rauchender Salzsäure differenziert und dann 10 min unter fließendem Wasser gebläut.

- Lichtgrün (Merck^(R))

Es wurde 5 min gefärbt und dann 5 min unter fließendem Wasser gewaschen.

- Papanicolaus Lsg. 1a Merck^(R)

Das Färbeprinzip entspricht der Färbung mit Mayers Hämalan. Da jedoch Harrison's Hämatoxin alkoholhaltig ist, wurde durch die Gegenfärbung die immunhistochemische Empfindlichkeit etwas herabgesetzt.

Das Eindecken erfolgte mit Kaisers Glyzeringelatine (Merck^(R)).

1.4.2. Immunhistochemische Untersuchungen

1.4.2.1. Direkte Immunhistochemie

Materialien:

- Anti-Maus-IgG Ak, (Amersham)
- Anti-Mensch-IgG Ak, (Amersham)
Beide Antikörper sind mit Meerrettichperoxidase
(Horseradishperoxidase (HRP)) konjugiert und
speziesspezifisch gereinigt
- PBS pH 7,4 (Sigma)
- FKS (Fetales Kälberserum (Flow Lab.)) mit
Zusatz von 3-5% Rinderalbumin
3AEC (3-Amino 9-ethylcarbazol lsg.) zur
Farbsubstratherstellung
Azetatpuffer pH 5,2
- 3% Wasserstoffsuperoxid

Methode:

Das in Azeton 10 min lang fixierte Präparat wurde für
ca. 5 min in PBS überführt, leicht abgetrocknet und mit
FKS (1:40 verdünnt) 20 min lang überschichtet.

Dann wurde das FKS abgesaugt und das Anti-Maus IgG-HRP
(1:50 verdünnt) 1 Stunde lang aufgetragen.

Nach Absaugen und dreimaligem Waschen (insgesamt 10 min)
mit PBS wurde das Farbsubstrat (3AEC / Acetat-Puffer /

H₂O₂) für 20 min aufgetragen. Dieses wurde erst kurz vo
r Gebrauch hergestellt und filtriert.
Alle Inkubationsvorgänge erfolgten bei 37 °C.

Folgende Kontrollen wurden durchgeführt:

- Ein unspezifisches Serum von derjenigen Spezies, aus
der der Antikörper gewonnen wurde, wurde statt des
ersten Antikörpers aufgetragen.

- Nur das Farbsubstrat mit und ohne Inkubation mit FKS wurde aufgetragen.

Der dazugehörige Gegenversuch mit den entsprechenden Kontrollen wurde mit Anti-Mensch IgG-HRP (1:25 verdünnt) durchgeführt.

1.4.2.2. Indirekte Immunhistochemie

Materialien:

- monoklonaler Antikörper Ma 10-11 (Ratten IgG_{2a} als ein gegen humanes Gewebe gerichteter Ak.
- Anti-Ratte-IgG Ak, HRP-konjugiert (Amersham)
- PBS pH 7,4 (Sigma)
- FKS (Fetales Kälberserum (Flow Lab.)) mit Zugabe von 3-5% Rinderalbumin
- 3AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol Lsg.) zur Farbsubstratherstellung
- Azetatpuffer pH 5,2
- 3% Wasserstoffsuperoxid

Methode:

Die Präparate wurden wie bei der direkten Immunhistochemie vorbehandelt.

Nach Absaugen des FKS (Inkubation 20 min) wurde der erste Antikörper (Ma-10-11, 1:200 verdünnt) aufgetragen und 45 min lang inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (10 min) folgte der zweite Antikörper (Anti-Ratte IgG-HRP, 1:200 verdünnt). Die Schnitte wurden eine Stunde lang inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde das kurz davor hergestellte Farbsubstrat für 20 min aufgetragen.

Alle Inkubationsvorgänge erfolgten bei 37 °C.

Folgende Kontrollen wurden durchgeführt:

- 1. Antikörper wurde durch PBS ersetzt
- 1. Antikörper wurde durch unspezifischen Rattenserum ersetzt
- 2. Antikörper wurde durch PBS ersetzt
- Beide Antikörper wurden durch PBS ersetzt.

1.4.3. Beurteilung der Schnitte

Die Beurteilung erfolgte mit dem Lichtmikroskop Leitz Dialux, die photographische Dokumentation mit Zeiss Ultraphot 2.

1.4.4. Speziespezifische Kernfärbung zur Differenzierung humaner und muriner Zellen

Die 6 µm dünnen Schnitte wurden sofort nach dem Schneiden in einer Methanol-Eisessig Lsg. (Methanol abs. : Eisessig abs. =3:1) 10 min lang bei Zimmertemperatur fixiert.

Die Fluorochromierung der Präparate erfolgte mit Bisbenzimid (Hoechst 33258) (Stammlösung 50 µl/ml Bisbenzimid und Timerosal 1:1000 mit Mc Ilvain's Puffer (pH 5.5) 1:5 verdünnt). Damit wurde das Präparat für 1-2 min überschichtet. Nach dem Abwaschen konnten die Präparate sofort im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Auflicht Fluoreszenzmikroskop) betrachtet werden. Auf Grund der Abnahme der Anregbarkeit des Bisbenzimid nach 1-2 Wochen ("fading") waren die Schnitte auch im Dunklen nur beschränkt haltbar.

Alle immunhistochemisch untersuchten Tumoren wurden auch auf diese Weise untersucht.

1.5. Biokinetik und Immunszintigraphie im Vergleich zur Tumorphistologie

1.5.1. Immunszintigraphie

Bei einem Tumordurchmesser von ca. 0,5 cm wurde den mit Äther narkotisierten Tieren I 131 markierter intakter Antikörper i.v. (Schwanzvene) verabreicht.

Bei ColCa 1 (3. Pass.) wurde ein intakter monoklonaler Anti-CEA Antikörper mit einer spezifischen Aktivität von 170 MBq/mg Antikörper (CIS) eingesetzt. Jedem Tier wurde im Mittel eine Aktivität von 2,20 MBq I 131 MAK in 0,2 ml PBS-Lösung verabreicht.

Für Maca F (36. Pass.) und HoCa 5 (4. Pass.) wurde den Tieren ein intakter monoklonaler Antikörper I 131-Tumak verabreicht (TUMAK BW 495/36, IgG₃ von Hoechst gegen Mammakarzinome entwickelt). Jedes Tier erhielt 2,20 MBq I 131-MAK in 0,2 ml PBS-Lösung (spezifische Aktivität des Antikörpers war 232 MBq/mg).

Auf Grund von Dejodasen im Organismus wird ein Teil des Jodids in vivo von den Immunglobulinen abgespalten und reichert sich in der Schilddrüse an. Um diese Anreicherung zu verhindern, wurde drei Tage vor Versuchsbeginn eine Schilddrüsenblockade mit Irenat^(R) (Troponwerke) (Natriumperchlorat 3,6 mg/ml Trinkwasser) durchgeführt. Vor jeder Aufnahme wurden die Tiere mit 100 mg Keta-
nest^(R) und 10 mg Rompun^(R)/kg Körpergewicht narkotisiert.

Die szintigraphischen Aufnahmen wurden mit einer Gamma-Kamera (Phillips) mit 2 mm pin-hole Kollimator durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit "Gamma 11" (Vers. 3B) (Software von DEC für das Betriebssystem RT-11 F/B). Die Aufnahmezeitpunkte betrugen für ColCa 1: sofort, 24 h, 48 h und 144 h.

Die Aufnahmezeitpunkte betrugen bei MaCa F und HoCa 1: 24 h, 48 h, 144 h, 312 h.

Es wurden jedesmal die selben festen Aufnahmeparameter beibehalten:

- Konstanter Abstand zwischen Tier und Kollimator.
- ventrodorsale Lagerung der Tiere mit möglichst weit gespreizten Gliedmaßen
- Energieeinstellung der Kamera auf den 365 keV peak bei einem Fenster von 20% für die I 131 Messung
- Automatische Aufnahmebeendigung nach Zählung von 40 000 Impulsen
- Digitale Computerspeicherung der Daten in einer 64x64 Zellmatrix

1.5.2. Ganzkörpermessung zur Ermittlung der Retention der applizierten Aktivität:

Zur Ermittlung der Retention des markierten intakten Antikörpers wurden Messungen mit einem Kleintierganzkörperzähler (Berg 1982) an Mäusen durchgeführt, die in einer Plexiglasröhre immobilisiert wurden.

Der Kleintierganzkörperzähler besteht aus zwei Detektoren (12,7 x 10,1 cm NaI Kristalle), mit 5 cm Blei und 5 mm Kupfer abgeschirmt. Zur Registrierung der entsprechenden Energiespektren erfolgt ein Anschluß an einen Vielkanalanalysator. Alle Retentionswerte wurden durch die Gammaspektroskopie ermittelt und auf Null effekt und physikalischen Zerfall korrigiert. Die erste Retentionsmessung erfolgte unmittelbar nach der Applikation des markierten Antikörpers und diente als Bezugs wert für folgende Messungen. Die Retention wurde berechnet als Prozentsatz der applizierten Aktivität (100 %).

Die Messungen wurden in bestimmten Abständen durchgeführt.

ColCa 1: sofort, 24 h, 48 h, 120 h und 144 h.

MaCa F/HoCa 5 (h): sofort, 24 h, 48 h, 144 h, 216 h,
312 h.

1.5.3. Biokinetische Studien

Zur Untersuchung der Biokinetik der verabreichten markierten Antikörper und zur Feststellung des Zeitpunktes des höchsten Tumor-Blut Quotienten im Tumor, wurden die Tiere (Nummern in Klammer) gruppenweise in bestimmten Abständen mit Kohlendioxidgas abgetötet.

ColCa 1: 24 h (3, 7, 8)

48 h (5, 6, 9)

144 h (1, 2, 10)

MaCa F/HoCa 5: 24 h (1, 2, 3)

(H) 48 h (4, 5, 6, 3 H, 4 H)

144 h (7, 8, 9, 5 H, 6 H)

312 h (10, 11, 12, 13, 7 H, 8 H)

Die Organe bzw. Gewebeproben (Blut, Schilddrüse, Lunge, Leber, Niere, Milz, Magenwand, Colonwand, Muskel und Femur) sowie der Tumor wurden entnommen und gewogen. Ein Teil des Tumors wurde nach 1.3.2.1. eingefroren. Das restliche Tumorgewebe wurde nochmals gewogen und zusammen mit den präparierten Organen bzw. Gewebeproben und Blut wurden in einem Bohrlochszintillationszähler (Gammaszint BF 5300, Berthold) die Impulsraten bestimmt. Um den Anteil der in der Probe enthaltenen Aktivität auf die injizierte Aktivität beziehen zu können, wurde zusätzlich die Impulsrate einer Standardprobe (1% der applizierten Dosis /Tier) gemessen. Aus den so ermittelten Meßwerten und den Gewichten der Organe bzw.

Gewebe- und Blutproben wurde die Aktivitätskonzentration im Gewebe berechnet und zwar als Prozentsatz der applizierten Dosis pro Organ bzw. als Prozentsatz der verabreichten Dosis pro Gramm Gewebe. Das Gesamtblutvolumen wurde als 7,5% Anteil des Körpergewichts bestimmt (Senekowitsch 1985).

1.5.4. Immunhistochemische Untersuchung der szintigraphierten Tumoren

Nach Abklingen von I 131 wurden immunhistochemische Untersuchungen (indirekte Methode) am Tumor durchgeführt (Kap. 3.4.2.1./2.).

Als zusätzliche Materialien wurden benötigt:

- Anti-Maus-IgG Antikörper (Amersham)
- Anti-CEA Antikörper (Klinikum Großhadern) (nicht markiert)
- Tumak (Hoechst)(TUMAK BW 495/36 nicht markiert)

Die beiden letzten Antikörper waren monoklonalen Ursprungs.

2. ERGEBNISSE

2.1. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Ergebnisse werden in zwei Abschnitten dargestellt.

Als erstes erfolgt anhand ausgewählter Beispiele ein Vergleich zwischen den angewandten immunhistochemischen Methoden. Anschließend werden die aufgetretenen histologischen Veränderung während der untersuchten Passagen beschrieben.

2.1.1. Direkte Immunhistochemie

Bei der direkten Immunhistochemie wurden zwei unterschiedliche Antikörper angewendet:

- Anti-Maus-Immunglobulin
- Anti-Mensch-Immunglobulin

Anti-Maus-IgG Ak (HRP-konjugierter Antikörper):

Am Beispiel des Mammakarzinoms (MaCa F, 33. P., Abb. 5,6): Das in der Subkutis innerhalb von ca. 5 Wochen zu einer Größe von 0,5 cm heranwachsende Adenokarzinom war von einem, 2-3 Zelllagen breiten Interstitium durchzogen, welches kleinere und größere Tumorklappen umschließt. Das Interstitium zeigte eine intensive Affinität zum verwendeten Antikörper und wies daher eine deutliche Rotfärbung auf. Die Tumorzellen, die die Klappen bilden, besaßen eine polygonale Gestalt, beinahe einheitlicher



Abb. 5: Mammakarzinom (MaCa F, 33.P., 0 0,5 cm)
Vergr. 380 fach
Direkte Immunhistochemie mit Anti-Maus IgG Ak
→ Subkutis → Stroma → Parenchym



Abb. 6: Mammakarzinom (MaCa F, 33.P., 0 0,5 cm)
Vergr. 600 fach
Direkte Immunhistochemie mit Anti-Maus IgG Ak
→ Stroma → Parenchym

Größe und einen großen, zentral gelegenen Kern. Bei 600 facher Vergrößerung war eine schwache, rote Färbung der Zellmembran erkennbar. Die Tumorzellen selbst waren nur gegengefärbt, eine Reaktion mit Anti-Maus IgG konnte nicht beobachtet werden.

Der Tumor war deutlich mit murinem, stark Antikörper-positivem Bindegewebe umrandet. Auch die Subkutis und das Korium waren deutlich gefärbt. Vom Stratum basale aufwärts war jedoch nur eine sehr schwache Anfärbbarkeit der Epidermis feststellbar. Die Haarfollikel als röhrenförmige Einstülpungen des Oberflächenepithels reagierten ebenfalls negativ.

Beispiel Magenkarzinom (MagCa 1):

Das nach 4 Wochen herangewachsene Adenokarzinom mit einem Durchmesser von 0,5 cm war von Antikörper-positiven Bindegewebszellen umgeben, die in unregelmäßig langen und breiten Zügen in das Innere des Tumors ziehen. Das Plasma-Kern-Verhältnis war zugunsten des zentral gelegenen Kernes verschoben, die Zellgröße war stark schwankend und eine Färbung der Zellmembranen nicht feststellbar. Plasma und Kern waren ebenfalls nicht gefärbt. Die disseminiert auftretenden Nekrosen beinhalteten rot gefärbte Zellbruchstücke. Die Unterscheidung zwischen dem menschlichen und murinem Gewebe war oft auf Grund der undeutlichen Farbübergänge schwierig.

Dieses Adenokarzinom wies einen weniger differenzierten Zustand auf als das oben beschriebene Mammakarzinom.

Auch bei den untersuchten ColCa 1 (Kolonkarzinom) und HoCa 5 (Hodenkarzinom) ließen sich gleiche Feststellungen treffen:

- positiv (rot) dargestellt war das umgebende murine Bindegewebe und das versorgende Stroma
- negativ (nur blaue Gegenfärbung sichtbar) war das eigentliche Tumorparenchym und Oberflächenepithel

Anti-Mensch-IgG Ak (HRP-konjugierter Antikörper):

Beispiel Mammakarzinom (Maca F, 33.P.) Abb. 7:

Die Anfärbbarkeit des Gewebes war allgemein schwach, aber ergab trotzdem eine ganz eindeutige Differenzierung: Das Stroma war negativ, die Zellwände waren deutlich gerötet, Plasma und Kern stellten sich etwas schwächer dar, waren aber eindeutig positiv.

Die anderen untersuchten Tumoren stellten sich auf dieselbe Weise dar.

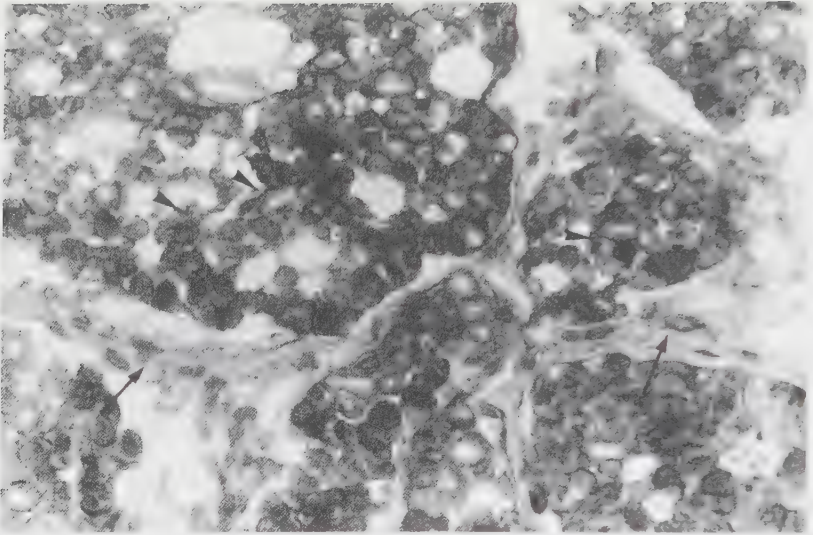


Abb. 7: Mammakarzinom (MaCa F, 33.P., Q 0,5 cm)
 Vergr. 600 fach
 Direkte Immunhistochemie mit Anti-Mensch IgG Ak
 —→ Stroma ► Parenchym

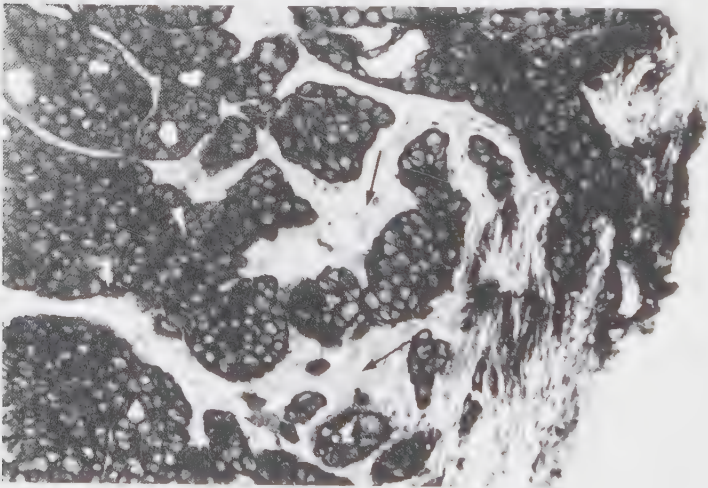


Abb. 8: Mammakarzinom (MaCa F, 33.P., Q 0,5 cm)
 Vergr. 380 fach
 Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11 (Anti-Mensch)
 —→ Stroma ► Parenchym

2.1.2. Indirekte Immunhistochemie mit Ma-10-11 als Primärantikörper

Beispiel Mammarkarzinom (MaCa F., 33.P.) Abb. 8:

Die Färbung war selbst bei hoher Antikörperverdünnung sehr kontrastreich. Das Tumorgewebe, insbesondere die Zellwand und das Zellplasma zeigte sich stark positiv. Die Kerne stellten sich dagegen schwächer positiv dar. Das Stroma reagierte negativ. In den Schnitten traten vereinzelt und unregelmäßig positive Reaktionen auf, die auch nach alleiniger Behandlung des Schnittes mit dem Farbsubstrat bestehen blieben (falsch-positive Befunde).

Bei dieser Maca F - immunhistochemischen Darstellung ist nicht nur allgemein der Stroma-Parenchym Kontrast deutlich, sondern es wird speziell auch die Abkapselung des Tumors durch das murine Bindegewebe klar dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung sieht man, wie die murine Bindegewebskapsel von dem immer weiter wachsenden Tumorparenchym durchbrochen wird.

Gleiche Befunde konnten auch bei der Darstellung der anderen Tumoren erhoben werden:

- intensive positive (rote) Anfärbung der menschlichen Karzinomzellen, vorwiegend Plasma und Zellwand
- negative (blaue Gegenfärbung) Darstellung des murinen Stromas

2.2. Immunhistochemische Folgeuntersuchungen über mehrere Passagen

2.2.1. Kolonkarzinom (ColCa 1)

Patiententumor:

Es handelte sich um ein CEA-positives Adenokarzinom, bestehend aus Nestern einschichtigen Zylinderepithels mit stark vergrößerten, zentralgelegenen Kernen. Diese Zellnester waren von Bindegewebe umgeben.

Ausgangstumor, (nach 7 Wochen 0 0,5 cm):

Stroma:

Der Tumor war von einer dünnen Bindegewebsschicht umhüllt, die durch den Ma-10-11 Antikörper als von der Maus stammend identifiziert wurde. Dieses Bindegewebe zog als die Tumorzellen versorgendes Stroma in den Tumor hinein. Im zentralen Bereich des Karzinoms verbreiterte sich das Stroma bis auf das fünffache der umhüllenden Schicht (Abb. 9). Diese sehr dicht gepackten Zellen mit länglichen Kernen wiesen zwei unterschiedliche Eigenschaften auf. Etwa ein Drittel dieser Fläche reagierte mit Ma-10-11-AK positiv, der Rest dieser Zellen in Übereinstimmung mit anderen Stromazellen negativ.

Parenchym:

Das Tumorparenchym ließ sich in zwei unterschiedliche Teile gliedern (Abb. 10): Zu etwa einem Drittel bestand es aus einem gut ausdifferenzierten Kleinzystischen Adenokarzinom. Muzin oder muzinproduzierende Zellen waren nicht zu erkennen. Die ein- bis zweischichtig die Lumina auskleidenden kubischen bis zylindrischen Zellen mit basal

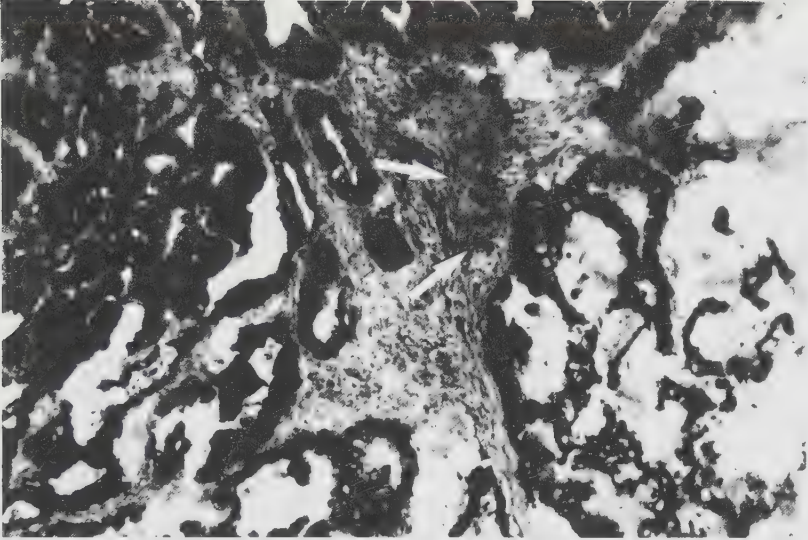


Abb. 9: Kolonkarzinom (ColCa 1, Ausgangstum., 0,5 cm)
Vergr. 120 fach
Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11 (Anti-Mensch)
Zentrale Stromaatypie ➡

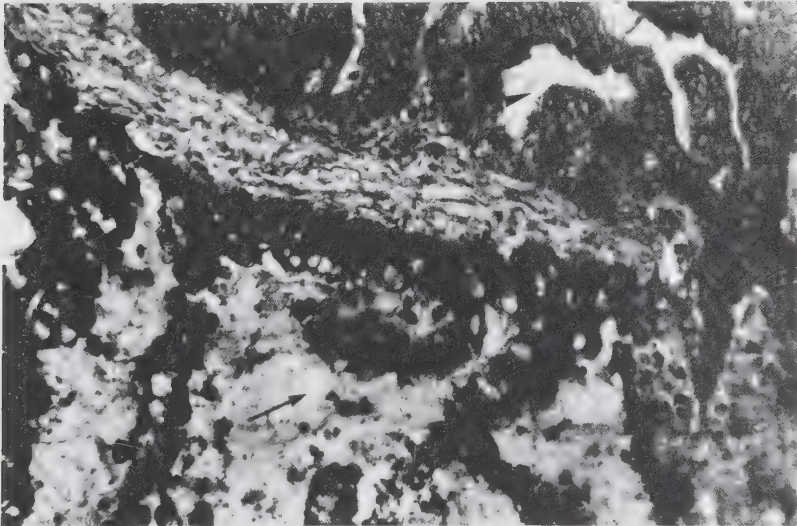


Abb. 10: Kolonkarzinom (ColCa 1, Ausgangst., 0,5 cm)
Vergr. 380 fach Indir. Immunhistochemie mit
Ma-10-11 (Anti-Mensch); zwei unterschiedliche
Parenchymstrukturen innerhalb eines Tumors
mucinreich ➡ ➡ mucinarm

gelegenen großen Kern waren CEA positiv, ebenfalls wie die luminal gelegenen Zellmembranabschnitte.

Das restliche Parenchym hatte ein großzystisches, zum Teil sogar bandartiges Aussehen. Große, mit Muzin gefüllte, teilweise ineinander übergehende Hohlräume wurden mit einem einschichtigen Epithel muzinproduzierender Zellen (Becherzellen) ausgekleidet (Carcinoma adenomatosum mucinosum = Gallertkarzinom).

Das hier versorgende Stroma war so dünn ausgezogen, daß es zum Teil nicht mehr eindeutig als solches zu identifizieren war.

1. Passage:

Von den hier untersuchten 4 Tumoren der 1. Passage, welche in der 6. Woche einen Durchmesser von ca. 0,5 cm besaßen, wies ein Tumor den erstbeschriebenen kleinzystischen Charakter auf (Abb. 11, 13), während die restlichen Karzinome nur aus großzystischen, filamentösen, und muzinerfüllten Elementen bestanden (Abb. 12, 14). Auffallende Veränderungen im Stromabereich waren nicht feststellbar.

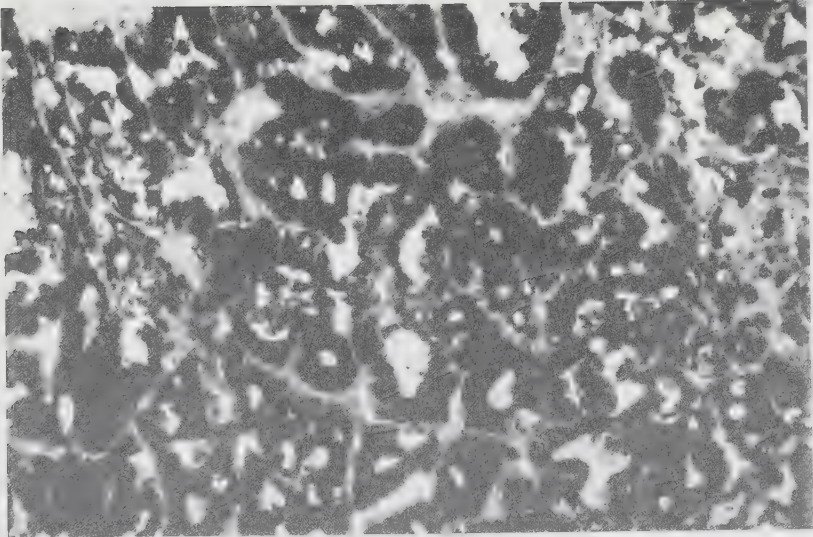


Abb. 11: Kolonkarzinom (ColCa 1, 1.P., 0 0,5 cm)
Vergr. 120 fach
Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11 (Anti-Mensch)
Tumor mit muzinarmer Histologie

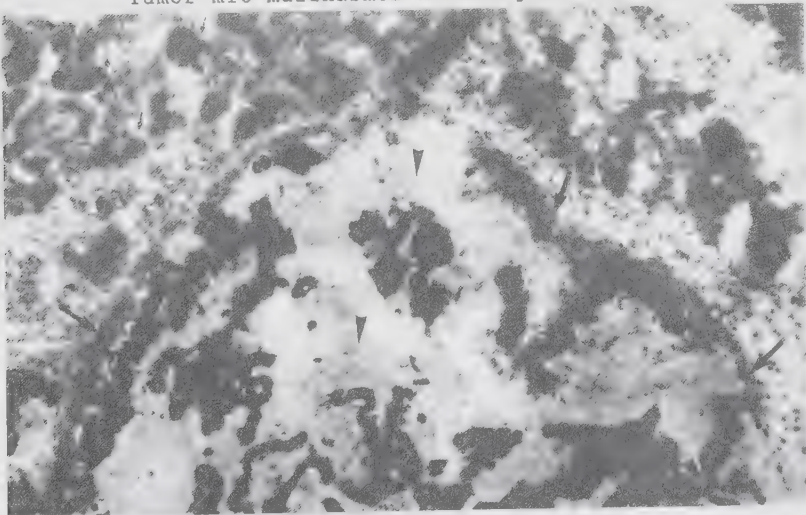


Abb. 12: Kolonkarzinom (ColCa 1, 1.P., 0 0,5 cm)
Vergr. 120 fach
Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11 (Anti-Mensch)
Tumor mit Muzinanreicherung ►
Muskelfaserquerschnitte → → Tumorkapsel →

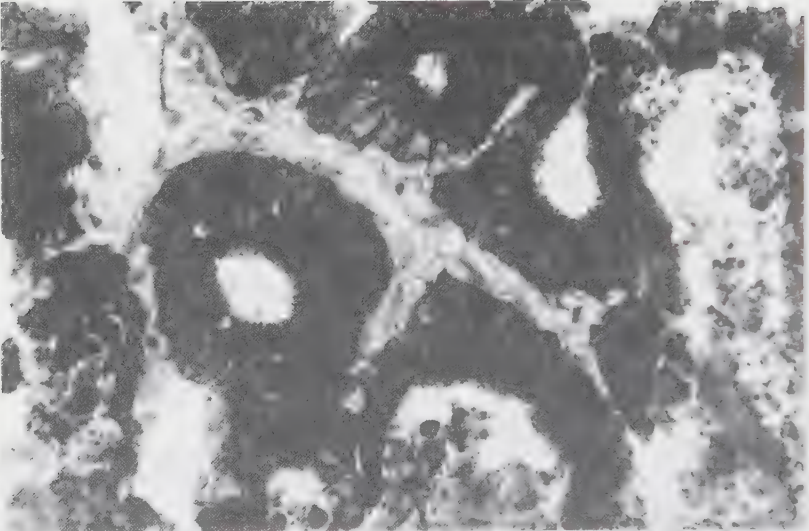


Abb. 13: Kolonkarzinom (ColCa 1, l.p., 0 0,5 cm)
Vergr. 600 fach
Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11 (Anti-Mensch)
Tumor mit muzinarmer Histologie

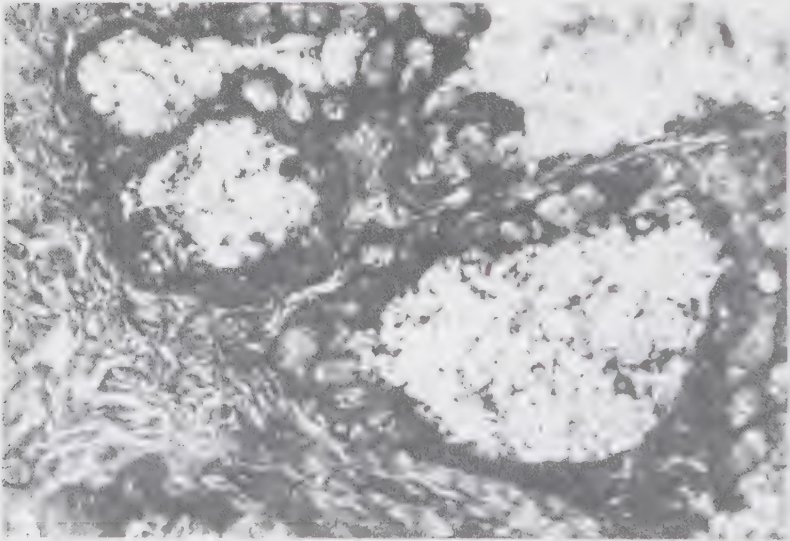


Abb. 14: Kolonkarzinom (ColCa 1, l.p., 0 0,5 cm)
Vergr. 600 fach
Indir. Immunhistochemie mit Anti-CEA Ak
Tumor mit Muzinanreicherung

2.-4. Passage:

In diesen Passagen traten nur Tumoren mit großzystischen muzinproduzierenden Strukturen auf (Abb. 15). Bei Überschreiten eines Durchmessers von 0,5-1 cm fanden sich disseminierte Nekrosen. Die Beobachtungen wurden bis zur 4. Passage fortgesetzt. Kleinzystische Strukturen wie in Abb. 12/14 traten nicht mehr in Erscheinung.

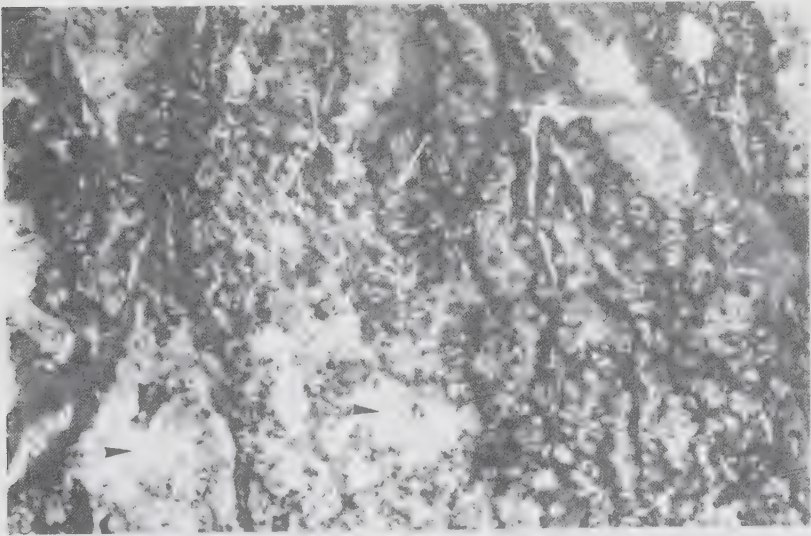


Abb. 15: Kolonkarzinom (ColCa 1, 3.P., 0 0,7 cm)
Vergr. 120 fach
Indir. Immunhistochemie mit Anti-CEA Ak
Tumor mit Muzinanreicherung ►
u. zentr. Nekrose —→

2.2.2. Hodenkarzinom (HoCa 5)

Patiententumor:

Der Tumor bestand aus drüsigen und papillären Strukturen, die mit einem ein- bis zweischichtigen, kubischen bis hochprismatischen Epithel mit mittelgroßen, zentral gelegenen Kernen ausgekleidet waren (Abb. 16). Dazwischen lagen unregelmäßig angeordnet Bindegewebszüge, nekrotische Bezirke und reichlich Infiltrate mononukleärer Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Histiozyten, Plasmazellen).

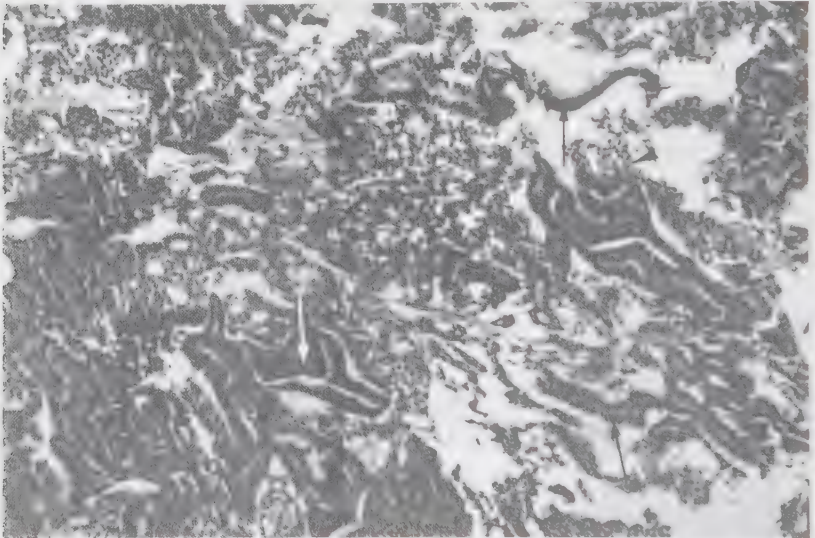


Abb. 16: Hodenkarzinom (HoCa 5, Patientent.)
Vergr. 120 fach HE-Färbung
Hochgradig atypisches Epithel →
entz. Infiltrate ►

Ausgangstumor:

Der Tumor wurde 4 Wochen nach der Transplantation mit einem Durchmesser von 0,4 - 0,7 cm untersucht. Eine optimale und eindeutige Färbung war nur bei Ma-10-11 möglich. Auf den Schnitten war eine perlschnurartige Aneinanderreihung unterschiedlich großer Zellen zu erkennen. Dazwischen zog sich das ungefärbte murine Bindegewebe (Abb. 17). Durch eine dünne Bindegewebsschicht war das Adenokarzinom sowohl von der Haut als auch von der Thoraxmuskulatur getrennt.

Eine Tumorseite war eingebuchtet und mit dichtgepackten rundkernigen Zellen ausgefüllt (Abb. 18). Von dieser Ausbuchtung zogen Gewebszüge erst mit runden, später mit länglichen Kernen als Stroma in die Geschwulst, wo sie zwischen den kanalikulären Strukturen verliefen.

1. u. 2. Passage:

Auch in diesen beiden Passagen wurde eine optimale Darstellung nur mit der indirekten Methode erreicht.

Die Karzinomzellen zeigten eine deutliche Zeichnung der Zellmembranen. Die kanalikulären Strukturen waren nicht mehr so eindeutig im ganzen Gewebe ausgeprägt. Das negative Bindegewebe zog zwei bis drei Zellagen breit von der umgebenden Bindegewebskapsel in die Geschwulst hinein.

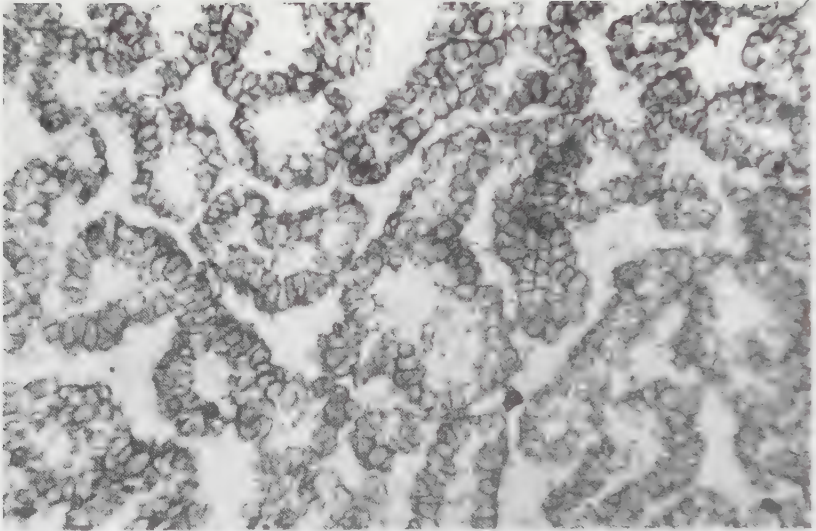


Abb. 17: Hodenkarzinom (HoCa 5, Ausgangstum. 0 0,4 cm)
Vergr. 380 fach
Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11
Perlschnurartige Parenchymstruktur

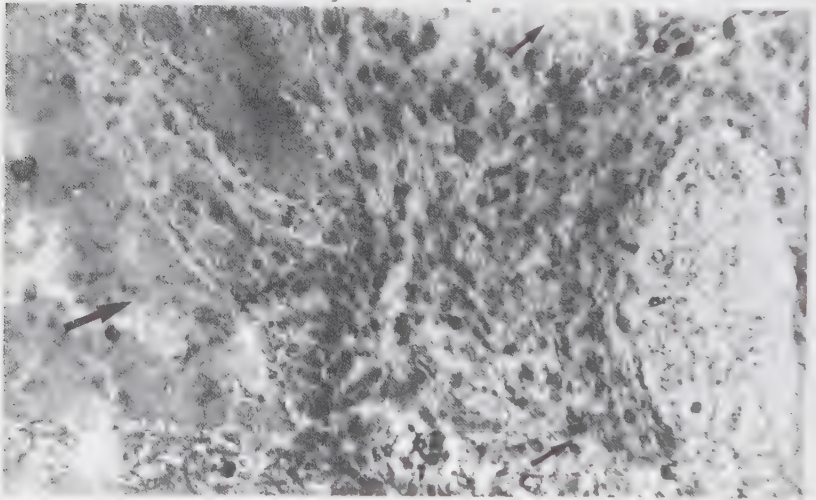


Abb. 18: Hodenkarzinom (HoCa 5, Ausgangst. 0 0,4 cm)
Vergr. 380 fach
Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11
Das Parenchym $\longrightarrow$ ist eingebuchtet. Die die
Einbuchtung ausfüllenden Zellkerne reagieren
negativ $\longrightarrow$

3. Passage:

Bei den in 4 Wochen auf eine Größe von 0,5 cm Durchmesser herangewachsenen Tumoren wurde die ursprüngliche Strukturierung immer undeutlicher. Die Karzinomzellen lagen nun dichter gepackt und besaßen unterschiedliche Größe. Ihre Zellwände waren deutlich positiv gefärbt (Abb.19). Zwischen den dicht gepackten Karzinomzellen zogen einige wenige, 10-15 Zelllagen breite Straßen murinen (Ma-10-11 Ak negativen) Gewebes mit sowohl rundlichen als auch länglichen Kernen. In den Tumoren lagen nekrotische Bereiche verstreut. Sie besaßen eine extrem dicke, abgrenzende Bindegewebskapsel.

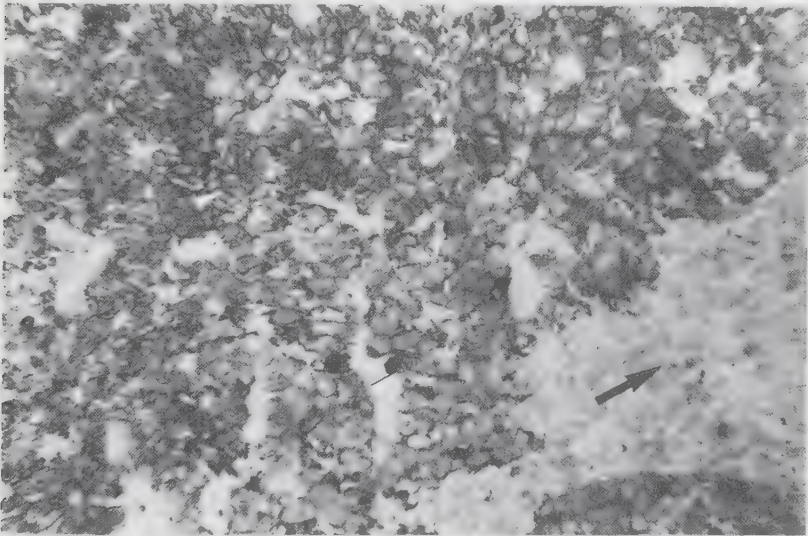


Abb. 19: Hodenkarzinom (HöCa 5, 3.P. Q 0,5 cm)
Vergr. 380 fach
Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11
Dichtgepacktes Parenchym ➤
Breites Stroma ➡

4.u. 5. Passage:

In beiden Passagen lag dicht gepacktes, strukturloses (Ma-10-11 Ak-positives) Tumorgewebe vor, von einigen dünnen murinen (negativen) Bindegewebssträngen durchzogen und von einer dünnen Bindegewebshülle umgeben.

2.2.3. Mammakarzinom (MaCa F):

Das Mammakarzinom, ein Adenokarzinom, wurde bereits zum Großteil unter 2.1.1./2.1.2. beschrieben (Abb. 5-8). Tumoren von der 31. bis zur 34. Passage wurden untersucht, wobei die jeweils untersuchten Tumoren eine Größe von ca. 0,5-1,5 cm nach 7 Wochen erreicht hatten. Sowohl mit der direkten als auch mit der indirekten Methode wurden brauchbare Ergebnisse erzielt.

Die histologische Struktur blieb während dieser Zeit unverändert: Dicht gepackte, regelmäßige, großkernige Karzinomzellhaufen waren gleichmäßig von Stroma durchzogen. Bei Tumoren mit Durchmessern über 0,5-1 cm wurden disseminiert auftretende Nekrosen festgestellt.

2.2.4. Magenkarzinom (MagCa 1):

Patiententumor:

Auf Grund der geringen Materialmenge fand eine histologische Befunderhebung nur in der Klinik statt.

Ausgangstumor:

Eine genaue Differenzierung zwischen dem murinen und humanen Anteil des Tumors (0 0,7 cm nach 4 Wochen) war mit dem direkten Färbeverfahren nicht gelungen. Die indirekte Methode erbrachte jedoch ein eindeutiges Ergebnis. Die unregelmäßig großen, hauptsächlich plasmapositiven Karzinomzellen lagen in verschiedenen Formationen vor. Genauso unregelmäßig zog das negative, ebenfalls großkernige Stroma in den Tumor hinein. Die Geschwulst wurde von einer bis zu zehn Zelllagen dicken Kapsel umgeben (Abb. 20).

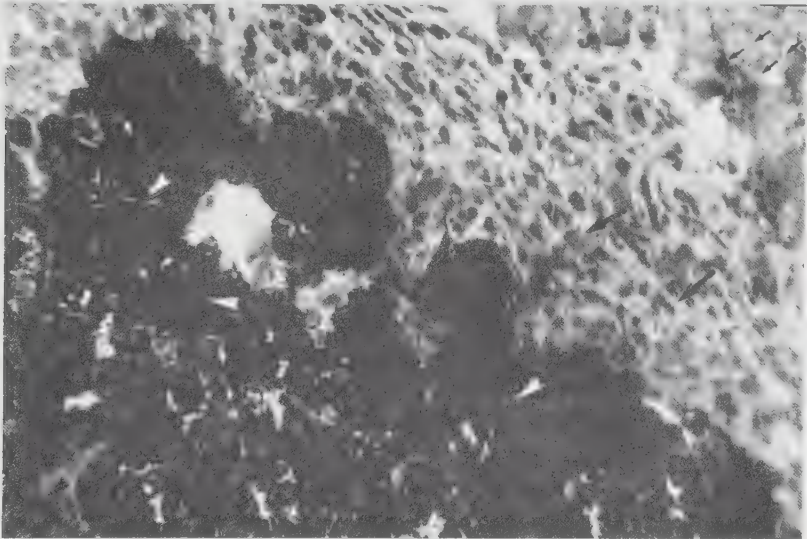


Abb. 20: Magenkarzinom (MagCa 1, Ausgangstumor, 0 0,7 cm)
Vergr. 380 fach
Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11
Unregelmäßige Parenchym ► -Stroma →
Verteilung, unten links Muskelfasern → →

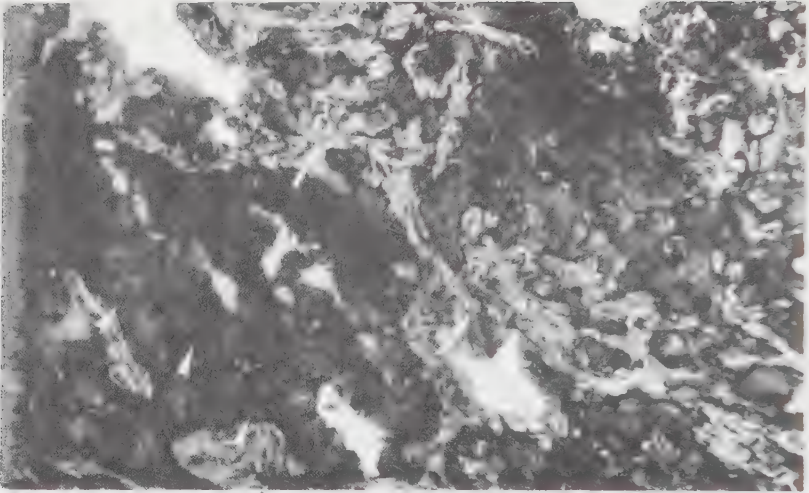


Abb. 21: Magenkarzinom (MagCa 1, 2.P. $\varnothing$ 0,7 cm)
 Vergr. 380 fach
 Indir. Immunhistochemie mit Ma-10-11
 Unregelmäßige Parenchym ► -Stroma ►
 Verteilung

1. Passage:

In der 1. Passage (nach 4 Wochen $\varnothing$ 0,6-1 cm) war die indirekte Methode eindeutiger. Unregelmäßige murine Bindege-
 websstrukturen durchzogen die Geschwulst. Die Karzinom-
 zellen selbst besaßen unterschiedliche Größen und Formen.
 Die Kern-Plasma Relation war zugunsten des Kernes verscho-
 ben, das murine Ak-negative Stroma war ohne auffallenden
 Befund.

2.-4. Passage:

Der histologische Befund blieb weitgehend unverändert er-
 halten (Abb. 21). Bei Überschreiten des Durchmessers von
 0,5 -1 cm des schnellwüchsigen Tumors traten disseminierte
 oder zentrale Nekrosen auf. Die nekrotischen Bereiche ent-
 hielten sowohl positive als auch negative Zellbruchstücke.

2.3. Bisbenzimiddarstellung

Mit der Bisbenzimiddarstellung, einem Verfahren, welches zu keinen dauerhaften Präparaten führt, gelang eine eindeutige Unterscheidbarkeit beider Tumoranteile. Murine Zellkerne enthielten phosphoreszierende Chromatinpunkte, die in menschlichen Zellkernen und somit auch in menschlichen Karzinomzellen nicht zu beobachten sind. Es konnten jedoch nur wirklich intakte, gut getroffene Kerne der Gefrierschnittpräparate differenziert werden. Eine 250-fache Vergrößerung war dafür nötig. Bei dieser Vergrößerung war es nicht mehr möglich, einen Überblick über die histologischen Zusammenhänge zu gewinnen. Auch feinere Gewebestrukturen konnten nicht beurteilt werden.

2.4. Zusammenfassung der immunhistochemischen und histologischen Untersuchungen

Die direkte Immunhistochemie konnte in den meisten Fällen keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Ihre Aussagekraft schien stark von der zu untersuchenden Tumorart abzuhängen. Die indirekte Immunhistochemie mit einem Ratte-Maus monoklonalen Antikörper (Ma 10-11) als erstem Antikörper führte in allen Fällen zur eindeutigen Charakterisierung des murinen und humanen Gewebes.

Innerhalb der ersten Passagen war in einigen Fällen eine zunehmende Veränderung der morphologischen Charakteristika möglich. Stromaveränderungen traten in den hier untersuchten Fällen nur temporär (d.h. in einzelnen Passagen) auf, verdrängten jedoch nie das humane Karzinomgewebe.

Die Bisbenzimiddarstellung konnte nur für sofortige Speziesanalysen benutzt werden, Passagenveränderungen waren auf Grund des schnellen Verblässens der Präparate nicht verfolgbar.

2.5. Biokinetische Studien

2.5.1. Kolonkarzinom (ColCa 1, 3.P.)

Die Ergebnisse der biokinetischen Studie des I 131- markierten anti-CEA Antikörper am Kolonkarzinom (ColCa 1, 3.P.) werden in der Tabelle 1 dargestellt. Die wichtigsten Parameter wurden der Übersichtlichkeit halber in die Abb. 22 übernommen.

Tabelle 1: Mittlere (n = 3) Aktivitätskonzentrationen des I 131 anti-CEA Ak in Organen und Tumoren in Abhängigkeit von der Zeit p.i. (Angaben erfolgen in Prozent der ursprünglich appl. Aktivität pro Gramm Gewebe).

Zeit p.i. (Stunden)	24	48	144
Tumor	21,9	16,2	13,6
Blut	12,9	10,1	4,37
Serum	25,5	17,8	8,26
Schilddrüse	48,8	33,0	90,6
Lunge	4,94	3,26	1,64
Leber	4,45	3,23	1,33
Niere	2,62	2,47	1,23
Milz	3,31	2,81	1,07
Magenwand	1,69	1,21	0,52
Muskel	0,74	0,63	0,25
Femur	1,60	1,28	0,64
Kolon	1,45	0,91	0,50
Pankreas	1,36	1,14	0,65

Die höchsten Aktivitätskonzentrationen im Tumorgewebe waren bereits nach 24 Stunden mit 21,9 %/Gramm erreicht. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch auch die Blut- (12,9 %/Gramm) und Serumaktivität (25,46 %/Gramm)

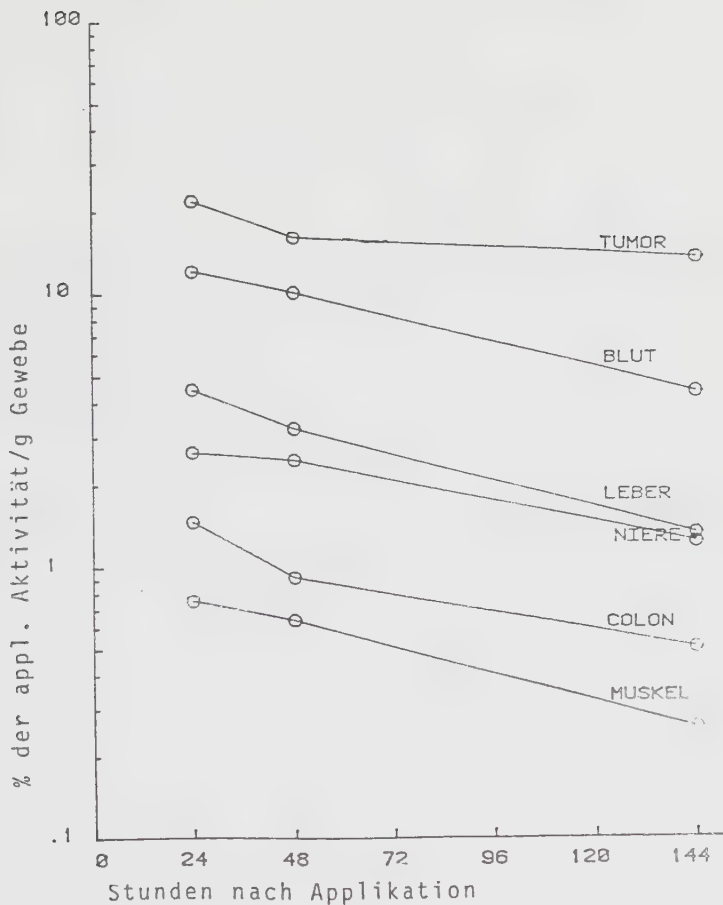


Abb. 22: Mittlere Aktivitätskonzentrationen des I^{131} anti-CEA Ak im Kolonkarzinom (ColCa 1) und in ausgewählten Organen in Abhängigkeit von der Zeit p.i.

sehr hoch, so daß der für die Szintigraphie wichtige Tumor/Blut Quotient zu diesem Zeitpunkt noch zu gering war (Abb. 23).

Erst 144 Stunden p.i. war eine gegenüber der Blut (4,37 %/Gramm)- und Serumkonzentration (8,26 %/Gramm) erhöhte Tumorkonzentration (13,63 %/Gramm) feststellbar. Der Tumor konnte nun durch die reduzierten Blutpoolwerte deutlicher dargestellt werden.

Die reich durchbluteten Organe (Lunge, Leber, Niere, Milz) enthielten im Vergleich zum Tumor geringe Aktivitätskonzentrationen.

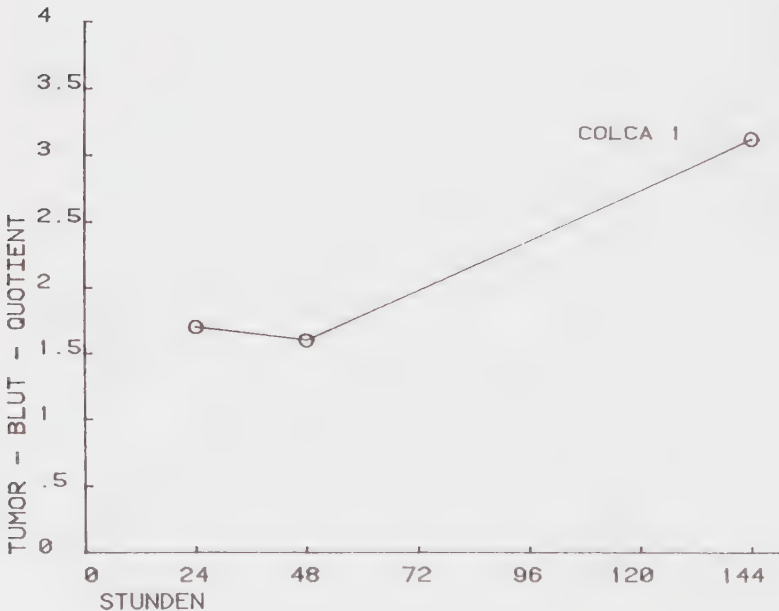


Abb. 23: Tumor/Blut Quotient für 1 131 anti-CEA Ak bei Kolonkarzinom (ColCa 1) in Abhängigkeit von Zeit p.i.

Wichtig war die bevorzugte Anreicherung des Antikörpers im Karzinomgewebe im Gegensatz zu normalem Kolongewebe.

Die Schilddrüse wies trotz der Blockade noch relativ hohe Werte auf. Wenn jedoch das Absolutgewicht der Schilddrüse in Betracht gezogen wird, welches 1-2 mg beträgt, so waren die hohen Prozentangaben/Gramm fast unbedeutend, denn die Gesamtaktivität für das Organ lag bei 0,4 %.

Bei Betrachtung der Einzelergebnisse fällt das Tier Nr. 2 durch die im Gegensatz zu anderen Tieren allgemein niedrigeren Werte (Faktor 3) auf, obwohl die sofort nach der Antikörperapplikation durchgeführte Ganzkörpermessung durchaus im Normbereich lag.

Da das Verhältnis der Tumor- und Blutaktivität für die szintigraphische Darstellbarkeit von Interesse ist, wurde der Tumor-Blut-Quotient bestimmt. Wie aus der Abb. 23 zu ersehen ist, war eine eindeutige Anreicherung des Antikörpers im Tumor nachweisbar. Der errechnete Faktor von 2-3,5 war für eine optimale Tumordarstellung zu gering.

2.5.2. Mammakarzinom (MaCa F, 35.P.)

Die Ergebnisse der biokinetischen Studie des I 131- markierten Tumak Antikörpers am Mammakarzinom (MaCa F, 35.P.) werden in der Tabelle 2 dargestellt. Die wichtigsten Parameter wurden der Übersichtlichkeit halber in die Abb. 24 übernommen.

Tabelle 2: Mittlere (n = 3) Aktivitätskonzentrationen des I 131 Tumak in Organen und Tumoren in Abhängigkeit von der Zeit p.i. (Angaben erfolgen in Prozent der appl. Aktivität pro Gramm Gewebe).

Zeit p.i. (Stunden)	24	48	144	312
Tumor	71,7	64,5	74,7	28,3
Blut	29,5	24,0	9,9	4,49
Serum	54,4	45,6	18,8	8,60
Schilddrüse	117,8	130,2	78,7	21,7
Lunge	15,4	11,3	4,3	1,95
Leber	7,08	5,21	1,94	1,02
Niere	8,64	5,55	2,26	0,93
Milz	6,80	4,36	2,18	1,13
Magenwand	4,32	3,34	1,49	1,07
Muskel	2,40	1,48	0,73	0,37
Femur	3,68	3,38	1,20	0,67
Kolon	3,17	2,56	1,17	0,52
Pankreas	2,93	2,70	0,99	0,63
Hoden	3,54	2,80	-	-
Mamma	-	7,81	2,71	1,14

Die höchsten Aktivitätskonzentrationen im Tumor wurden bereits nach 24 Stunden erreicht und blieben über 144 Stunden lang bestehen (ca. 70 %/Gramm) um dann nach 312 Stunden auf 28 %/Gramm abzusinken (Tab. 2, Abb. 28). Zu allen Untersuchungszeitpunkten enthielt der Tumor eine

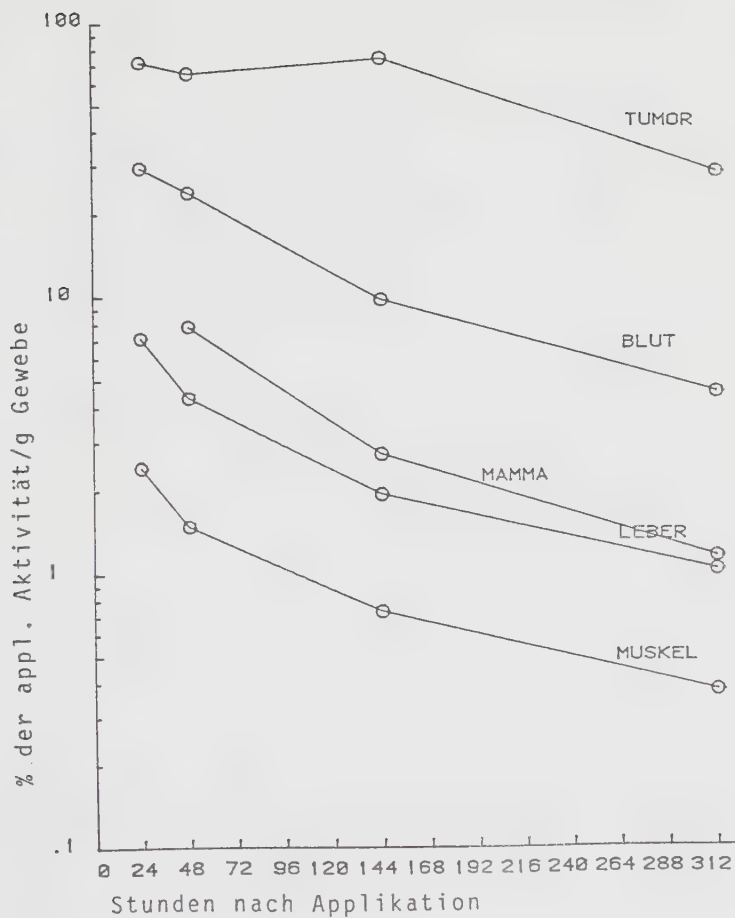


Abb. 24: Mittlere Aktivitätskonzentrationen des I^{131} Tumak im Mammakarzinom (MaCa F) Tumor und in ausgewählten Organen in Abhängigkeit von Zeit p.i.

höhere Aktivitätskonzentration als Blut und Serum. Der höchste Tumor-Blut-Quotient wurde nach 144 Stunden mit 7,6 erreicht (Abb. 25).

Ein gutes Differenzierungsvermögen des Antikörpers zwischen Mammagewebe und Mammakarzinom war ersichtlich. Nach einer Versuchsdauer von 312 Stunden war auf Grund der Ausscheidung die Restaktivität bereits so weit abgesunken, daß eine szintigraphische Darstellung erschwert wurde. Eine optimale Darstellung wurde nach 144 Stunden, zum

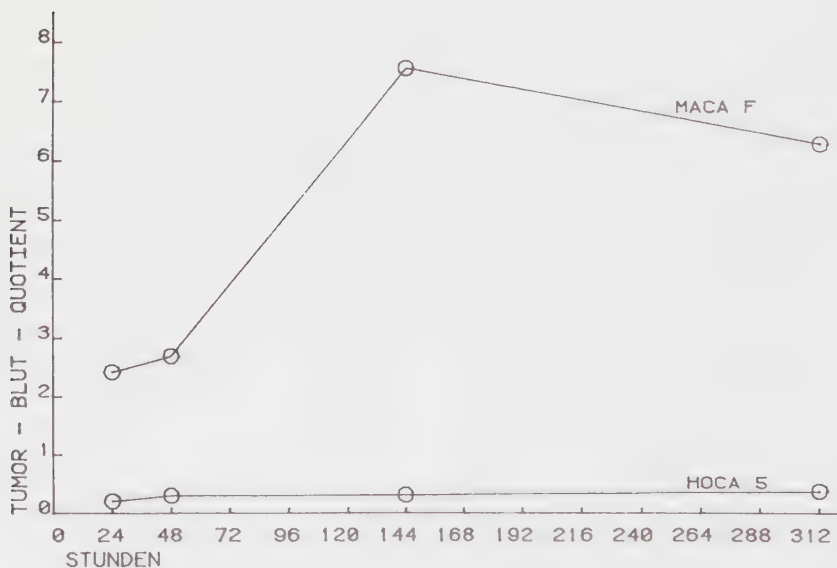


Abb. 25: Tumor/Blut Quotient für I 131 Tumak bei Mammakarzinom (MaCa F) und Hodenkarzinom (HoCa 5) in Abhängigkeit von Zeit p.i.

Zeitpunkt des höchsten Tumor/Blut Quotienten, erreicht.
Bei der Tumorbetrachtung konnten keine wesentlichen Abweichungen vom Mittelwert festgestellt werden.

2.5.3. Hodenkarzinom (HoCa 5, 4.P.)

Die Ergebnisse der biokinetischen Studie des I 131- markierten Tumak am Hodenkarzinom (HoCa 1, 4.P.) werden in der Tabelle 3 dargestellt. Die wichtigsten Parameter wurden der Übersichtlichkeit halber in die Abb. 26 übernommen.

Tabelle 3: Mittlere (n = 3) Aktivitätskonzentrationen des I 131 Tumak in Organen und Tumoren in Abhängigkeit von der Zeit p.i. (Angaben erfolgen in Prozent der appl. Aktivität pro Gramm Gewebe).

Zeit p.i. (Stunden)	24	48	144	312
Tumor	6,06	7,46	3,84	2,76
Blut	29,5	24,8	12,6	7,28
Serum	53,4	51,8	23,2	13,4
Schilddrüse	104,2	195,0	38,5	14,4
Lunge	13,4	13,1	5,26	3,43
Leber	6,50	4,31	2,60	1,37
Niere	7,91	7,31	3,28	1,45
Milz	8,47	6,67	2,98	1,73
Magenwand	2,69	4,30	1,85	1,12
Muskel	2,38	2,22	0,88	0,65
Femur	3,83	4,41	1,47	0,93
Kolon	3,56	4,29	1,60	0,87
Pankreas	3,27	3,83	1,34	0,91
Hoden	4,24	3,53	1,57	1,06

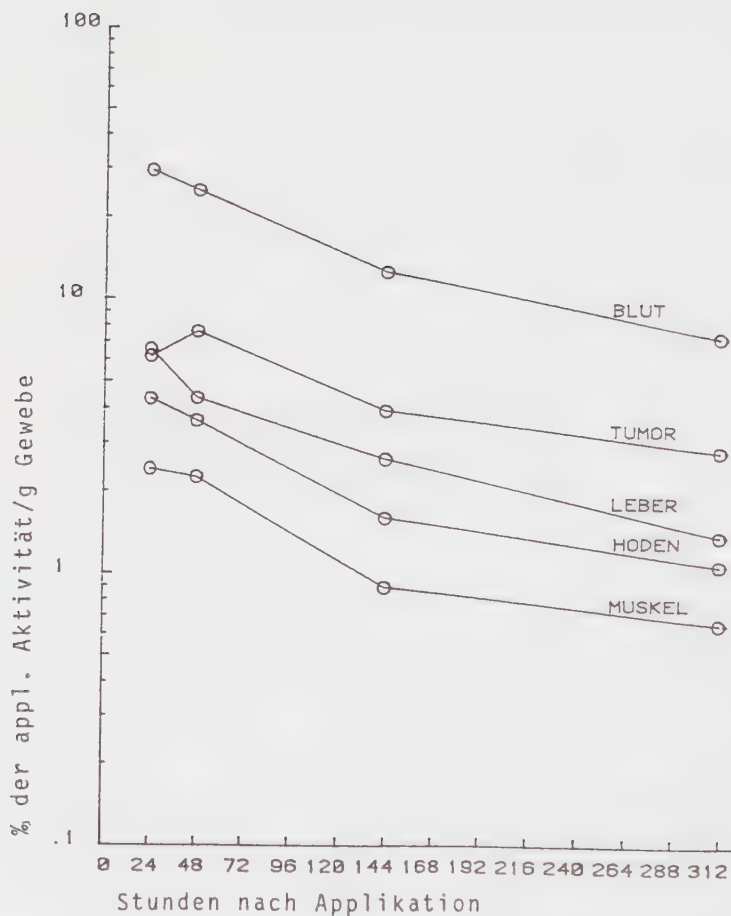


Abb. 26 Mittlere Aktivitätskonzentrationen des I 131 Tumak im Hodenkarzinom (HoCa 5) und in ausgewählten Organen in Abhängigkeit von Zeit p.i.

Bei Betrachtung der Organverteilung des Tumak in HoCa 5 fiel sofort die niedrige Tumoraktivität auf (max. 7,46 % pro Gramm Tumorgewebe) (Tab. 3, Abb. 30). Sie lag im Bereich der Werte der gut durchbluteten Organe und ein Vielfaches unter der Blut- bzw. Serumkonzentration.

Der Tumor/Blut-Quotient lag weit unter 1 (Abb.29).

Tumor- und Hodenaktivitäten lagen im ähnlichen Bereich und stellten sich somit nicht szintigraphisch dar (Abb. 25).

2.6. Bestimmung der Ganzkörperretention:

Die Bestimmung der Retention erfolgte mit einem Kleintier-ganzkörperzähler, wobei die jeweiligen Retentionsmeßwerte auf die unmittelbar nach der Injektion der Aktivität ermittelten Wert (100 %) bezogen wurden.

Nach der Applikation des markierten anti-CEA Antikörpers (Abb.27) erfolgte die Ausscheidung der Aktivität langsamer als nach der Applikation des I 131 Tumak Antikörpers (Abb. 28). Nach 24 Stunden waren erst 26% der Aktivität ausgeschieden worden, die Tumak Aktivität war bis zu diesem Zeitpunkt bereits auf die Hälfte reduziert. Die Halbwertszeit des anti-CEA Ak betrug dagegen 72 Stunden. Der steilste Abfall der Aktivität beruhte auf der Ausscheidung ungebundener Antikörper aus dem Blutpool bzw. des freien, von den Antikörpern abgespaltenen Jodids über die Niere.

In den darauffolgenden Tagen erfolgte die Elimination der Aktivität langsamer.

Nach 144 Stunden waren 26,3 % (ColCa 1) bzw. 15 % (MaCa 1 /HoCa 5) im Ganzkörper retiniert.

Die Retention des Tumak war im zeitlichen Verlauf bei MaCa F und HoCa 5 ähnlich, wobei jedoch auffallend war, daß sowohl die tumorfreien Kontrolltiere als auch die

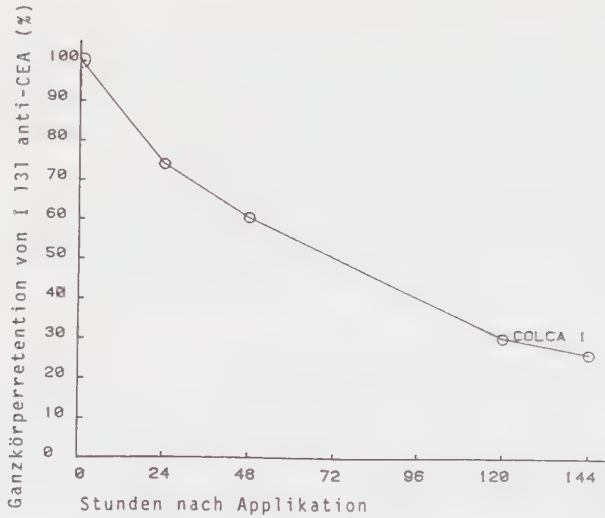


Abb. 27: Ganzkörperretention des monoklonalen I 131 anti-CEA bei Tieren mit Kolonkarzinom

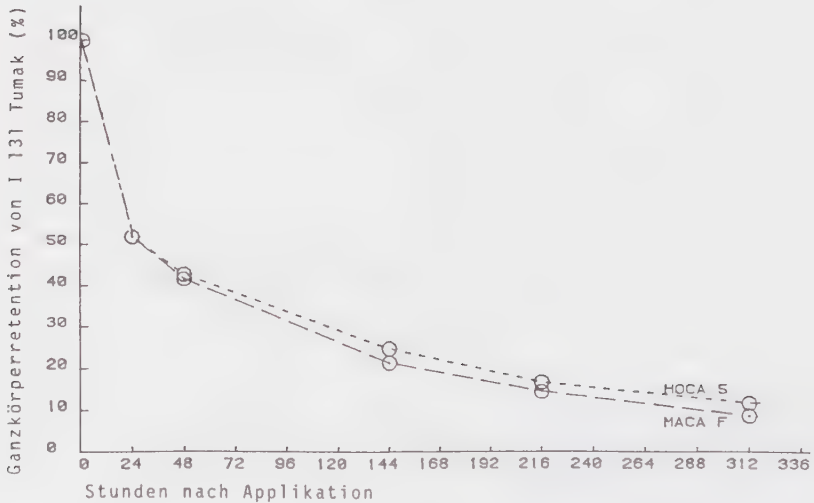


Abb. 28: Ganzkörperretention des monoklonalen I 131 Tumak bei Mamma- und Hodenkarzinom

Tiere mit dem szintigraphisch negativen Hodenkarzinomen ab 48 Stunden p.i. eine fast gleiche Retention aufwiesen, die um 2-3 % höher lag als bei den szintigraphisch positiven Mammakarzinomen.

Kolonkarzinom (ColCa 1, 3.P.)

nach I 131 anti-CEA Applikation

Tab. 4: Gegenüberstellung von Tumorgewicht (Gramm), Prozent der applizierten Aktivität/g Tumorgewebe und pro Tumor zum Abtötungszeitpunkt, der Ganzkörperretention, des prozentualen Anteils des Tumors an der Ganzkörperretention, der immunzintigraphischen Darstellung bis zur Abtötung, und der Histologie unter Berücksichtigung der Nekrose und der Bindegewebsatypien.

Tier Nr.	Tum. Gewicht (Gramm)	% appl. Akt. /g Tumor	% appl. Akt. /Tumor	GK - Retent. % appl. Akt.	% d. Tumors an der GK-Retent.	immunsz. Darst. 24 48 144	Histologie Nekr./Bdg.Atyp.
3	0,034	24,8	0,8	75,0	1,1	-	-
7	0,181	19,9	3,6	72,2	4,9	+	-
8	0,031	21,1	0,6	81,2	0,7	-	+
5	0,045	13,1	0,6	69,3	0,8	-	-
6	0,072	23,6	1,7	56,2	3,0	+	-
9	0,016	12,0	0,2	70,1	0,3	-	-
1	0,031	18,8	0,6	31,3	1,8	-	+
2	0,435	5,2	2,2	12,4	17,7	+++	+
10	0,066	16,8	1,1	30,1	3,6	-	-

Mamma- (MaCa F, 35.P.) und Hodenkarzinom (Hoca 1, 4.P.)(H)

nach I 131 Tumak Applikation

Tab. 5:

Gegenüberstellung von Tumorgewicht (Gramm), Prozent der applizierten Aktivität/g Tumorgewebe und pro Tumor zum Abtötungszeitpunkt, der Ganzkörperretention, des prozentualen Anteils des Tumors an der Ganzkörperretention, der immunscintigraphischen Darstellung bis zur Abtötung, und der Histologie unter Berücksichtigung der Nekrose und der Bindegewebsatypien.

Tier Nr.	Tum. Gewicht (Gramm)	% appl. Akt. /g Tumor	% appl. Akt. /Tumor	GK - Retent. % appl. Akt.	% d. Tumors an der GK-Retent.	immunsz. Darst. 24 48 144 312	Histologie Nekr./Bdg.Atyp.
1	0,133	67,5	8,9	54,2	16,5	++	+
2	0,253	48,8	12,3	53,7	22,9	++	+
3	0,240	98,8	23,7	54,2	43,8	++	-
1 H	0,465	6,1	2,8	53,6	5,2	-	+
4	0,199	46,4	9,3	45,6	20,3	++	-
5	0,221	74,5	16,5	40,1	41,0	++	-
6	0,191	72,7	13,9	41,7	33,4	++	+
3 H	0,563	7,1	4,0	43,0	9,2	-	+
4 H	0,164	7,8	1,3	44,1	2,9	-	++
7	0,057	83,6	4,8	22,6	21,2	+	+
8	0,277	63,1	17,5	15,2	91,2	+++	+
9	0,229	77,3	17,7	19,0	93,2	++	-
5 H	0,440	3,4	1,5	26,2	5,7	+	+
6 H	0,311	4,2	1,3	24,0	5,4	-	++
10	0,280	26,7	7,5	8,4	89,4	+++	+
11	0,123	38,6	4,8	7,0	67,8	+++	+
12	0,502	19,4	9,7	8,2	118,3	++	-
7 H	0,536	3,6	1,9	12,1	15,9	+	+
8 H	0,324	1,9	0,6	11,4	5,5	-	++

2.7. Immunszintigraphische Darstellung:

Alle Tiere wurden zu festgesetzten Zeiten nach der Injektion des I 131-markierten Antikörpers szintigraphiert und jeweils in Gruppen für die bereits besprochenen biokinetischen Studien abgetötet.

2.7.1. Szintigraphische Darstellung des Kolonkarzinoms (ColCa 1 (3.P.)) mit I 131 anti-CEA

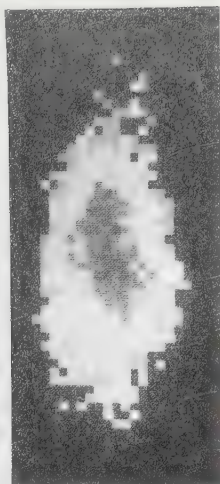
Auf der ersten Aufnahme, die sofort nach der Antikörperapplikation in die Schwanzvene durchgeführt wurde, zeigte sich die rasche Verteilung des Antikörpers innerhalb des Blutkreislaufes. Die Körperhöhle mit den reich durchbluteten Organen stellte sich gut dar (Blutpool). Die Schilddrüse stellte sich hier und auch in den späteren Aufnahmen auf Grund der Blockade mit Irenat^(R) nicht dar.

Bereits nach 24 Stunden (Abb. 29) traten die einzelnen Tumoren verschieden intensiv hervor. Während sich beim Tier Nr. 2 (Tumorgewicht 0,43 g, Tab. 4) bereits eine deutliche Anreicherung des radioaktiv markierten Antikörpers im Tumorgewebe zeigte, waren die anderen Tumoren kaum bzw. gar nicht szintigraphisch erfaßbar. Eine hohe Aktivität lag weiterhin im Bereich der blutreichen Organe (Blutpoolaktivität): Leber, Milz, Niere, Lunge, Herz.

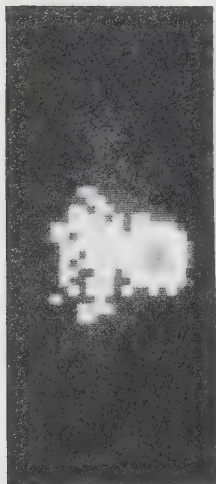
Nach 48 Stunden stellten sich bereits bei mehreren Tieren die Tumoren schwach dar, wobei die Darstellung bei Tier Nr. 2 (Tumorgewicht 0,43 g) und Nr. 6 (Tumorgewicht 0,071 g, Tab. 4) besonders gut war.



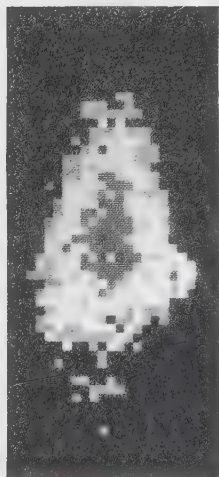
a)



b)



c)



d)

Abb. 29: Ganzkörperszintigramme von Nacktmäusen mit
Kolonkarzinomtransplantaten 24 h (a, b) und 144 h
(c, d) nach Applikation des ^{131}I anti-CEA

a)	ColCa 1	Tier 2	24 h	b)	ColCa 1	Tier 10	24 h
c)	ColCa 1	Tier 2	144 h	d)	ColCa 1	Tier 10	144 h

Erst nach der letzten Messung (144 Stunden) wurde ein deutlicher Abfall der Untergrundaktivität beobachtet, was zu einer verbesserten Tumordarstellung führte. Der Tumor von Tier Nr. 2 ließ sich weiterhin besser als die restlichen Tumoren darstellen (Abb. 29).

Aus den Ergebnissen der biokinetischen Studien in der Tabelle 4, in der sich das Tumorgewicht, die Aktivitätskonzentration in %/Gramm Tumorgewebe und die szintigraphische Darstellung gegenüberstehen, ist ein Zusammenhang zwischen diesen Parametern erkennbar: Je größer der Tumor, umso kleiner kann die Aktivitätskonzentration pro Gramm Tumorgewebe sein und umgekehrt, um eine szintigraphische Tumordarstellung zu erhalten. Weiterhin verbessert sich die szintigraphische Darstellung je höher der Anteil des Tumors an der gesamten Aktivitätskonzentration liegt.

2.7.2. Szintigraphische Darstellung des Mammarkarzinoms (MaCa F (35. P.)) mit I 131 Tumak

Bereits nach 24 Stunden ließen sich alle Tumoren szintigraphisch mit unterschiedlicher Intensität darstellen. Bei allgemein hoher Blutpoolaktivität stellte sich der Tumor von Tier Nr. 1 (Tumorgew. 0,13 g, Tab. 5) am schwächsten dar (Abb. 30).

Nach 48 Stunden waren alle Tumoren deutlich zu erkennen, am schwächsten Tumor Nr. 7 (Tumorgew. 0,057 g, Tab. 5), am deutlichsten, zu diesem Zeitpunkt auch mit der niedrigsten Blutpoolaktivität Nr. 8 (Tumorgew. 0,27 g, Tab. 5) (Abb. 30).

Nach 144 Stunden waren folgende Tumoren ohne jegliche Hintergrundaktivität zu erkennen: Nr. 8, 9, 12 (Tumorgew.

0,27 g, 0,23 g, 0,12 g, s.h. Tab. 5). Bei Nr. 7 (Tumorgew. 0,057 g, Tab. 5) wurde auf Grund der geringeren Tumoraktivität ein Großteil des Blutpools mit dargestellt.

Nach 312 Stunden war die Gesamtaktivitätsmenge deutlich zurückgegangen. Da bei jeder Aufnahme eine Gesamtimpulszahl von 40 000 aufsummiert wurde, ist bei den Tieren mit geringerer Restaktivität (Nr. 10, 12, 13) der Untergrund (background) deutlicher dargestellt (Abb. 31).

Wie bei der szintigraphischen Darstellung des Kolonkarzinoms erklären auch in diesem Fall die Ergebnisse der bio-kinetischen Studien die szintigraphische Tumordarstellung. Auch hier ist ein Zusammenhang zwischen dem Tumorgewicht, der Aktivitätskonzentration in %/Gramm Tumorgewebe und der szintigraphischen Darstellung feststellbar. Um eine ausreichende Tumordarstellung zu erhalten, kann bei einem größeren Tumor die Aktivitätskonzentration pro Gramm Tumorgewebe geringer sein und umgekehrt. Weiterhin verbessert sich die szintigraphische Darstellung je höher der Anteil des Tumors an der gesamten Aktivitätskonzentration liegt.

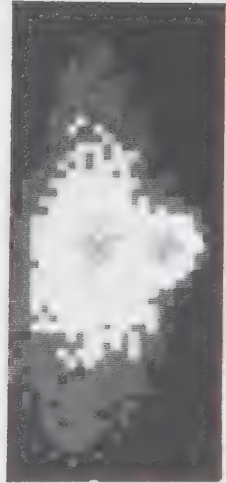
Dies wird besonders hier bei der hohen Affinität des I 131 Tumak Antikörpers zum Mammakarzinomgewebe deutlich.

2.7.3. Hodenkarzinom (HoCa 5 (4. P.)) mit I 131 Tumak

Eine sichtbare Anreicherung des monoklonalen Antikörpers Tumak konnte zu keinem Meßzeitpunkt nachgewiesen werden. Es erfolgte nur eine unspezifische Verteilung im Blutpool. Nach 312 Stunden wurden auf Grund der geringen Restaktivität bei der Zählung der vorgegebenen 40 000 Impulse auch die Impulse des Untergrundes mitberücksichtigt (Abb. 31).



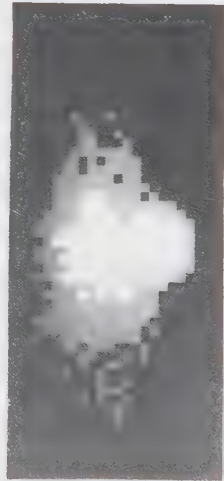
a)



b)

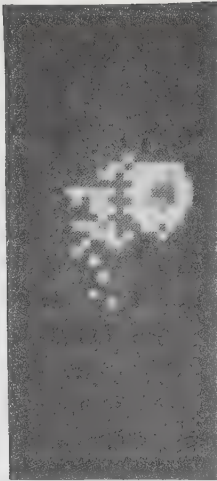


c)

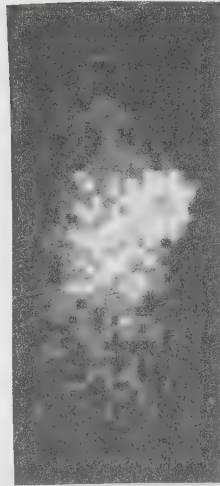


d)

Abb. 30: Ganzkörperszintigramme von Nacktmäusen mit
Mammakarzinomtransplantaten 24 h (a, b) und 48 h
(c, d) nach Applikation des I 131 Tumak
a) MaCa F Tier 1 24 h b) MaCa F Tier 3 24 h
c) MaCa F Tier 7 48 h d) MaCa F Tier 8 48 h

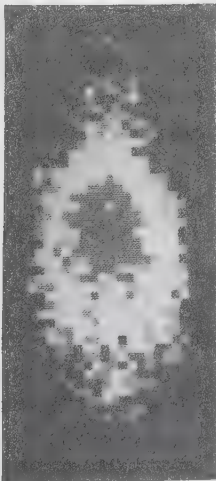


a)



b)

c)



d)

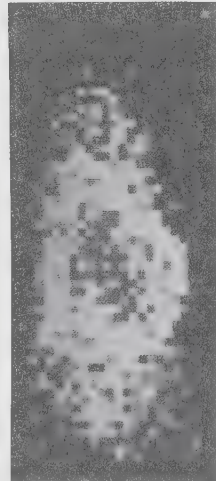


Abb. 31: Ganzkörperszintigramme von Nacktmäusen mit
Mammakarzinomtransplantaten 312 h (a, b) und mit
Hodenkarzinomtransplantaten 24 h (c) und 312 h
(d) nach Applikation des ^{131}I Tumak
a) MaCa F Tier 10 312 h b) MaCa F Tier 12 312 h
c) HoCa 5 Tier 5 24 h d) HoCa 5 Tier 5 312 h

2.8. Histologie der szintigraphierten Tumoren

Die genauere Histologie wurde bereits im ersten Teil der Ergebnisse beschrieben. Die auftretenden nekrotischen Anteile korrelieren mit dem Tumorgewicht. Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte bei allen Tumoren mit Ma-10-11 Antikörper. Das Kolonkarzinome wurden zusätzlich mit anti-CEA Antikörper, die Mamma- und Hodenkarzinome mit Tumak Antikörper untersucht, wobei jedesmal eine positive Reaktion erfolgte. Dabei war aber die Reaktion des Hodenkarzinoms mit Tumak sehr schwach.

Der anti-CEA Antikörper zeigte eine starke Bindung am apikalen Zellrand und verteilte sich etwas schwächer in den muzingefüllten Hohlräumen. Der Tumak Antikörper reagierte bei Mammakarzinomen eindeutig mit dem Tumorzellplasma, während dies bei Hodenkarzinomen nur schlecht erkennbar war.

Eine direkter immunhistochemischer Nachweis des injizierten I 131 anti-CEA im Kolonkarzinom bzw. ein direkter Nachweis des injizierten I 131 Tumak im Mammakarzinom ist nicht gelungen.

2.9. Gegenüberstellung von Tumorgewicht, Aktivitätskonzentration, szintigraphischer Darstellbarkeit, Histologie und Ganzkörperretention

Bei dem Vergleich zwischen Tumorgewicht, Aktivitätskonzentration, szintigraphischer Darstellbarkeit, Histologie und Ganzkörperretention konnten folgende Zusammenhänge festgestellt werden:

Im Gegensatz zum Hodenkarzinom zeigte sich eine hohe Anreicherung des Tumak im Mammakarzinom. Dabei verbesserte sich die szintigraphische Darstellbarkeit des Tumors mit

seiner steigender Größe.

Ein Zusammenhang zwischen der Aktivitätskonzentration/ Gramm Tumorgewebe und der Tumorgröße war an Hand der gegebenen Daten nicht feststellbar.

Ein deutlicher Zusammenhang besteht zwischen der Gesamtaktivität des Tumors, deren Anteil an der Ganzkörperretention und der szintigraphischen Darstellung.

Beim Kolonkarzinom (I 131 anti-CEA) (Tabelle 4) hat besonders die Aktivität pro Tumor einen deutlichen Einfluß auf die szintigraphische Darstellung. So stellten sich sich Tiere mit einer Tumorgesamtaktivität über 1 % positiv dar, während bei Werten unter 1 % kein szintigraphischer Nachweis möglich war. Der prozentuale Anteil des Tumors an der Ganzkörperretention blieb während des Untersuchungszeitraums nahezu gleich mit Ausnahme des Tieres Nr. 2 (17,7 %). Je höher der prozentuale Anteil des Tumors an der Ganzkörperretention lag, um so besser war die szintigraphische Darstellbarkeit.

Beim Mammakarzinom (I 131-Tumak) (Tabelle 5) stellten sich auf Grund der hohen Aktivitätskonzentration des Tumors alle Tumoren dar. Der prozentuale Anteil des Tumors an der Ganzkörperretention erhöhte sich mit fortschreitender Versuchszeit. Hier war eine deutliche Affinität des Tumak zum Mammakarzinom zu erkennen. Nach 312 Stunden waren fast 90 % des I 131-Tumak Antikörpers im Tumor lokalisiert, so daß die Strahlenbelastung für den Ganzkörper relativ gering war.

Die szintigraphische Darstellung des Hodenkarzinoms (I 131 Tumak) (Tabelle 5) war auf Grund der zum Mammakarzinom niedrigen Aktivität im Tumor und des niedrigen

prozentualen Anteils des Tumors an der Ganzkörperretention nicht gelungen. Die mittlere Aktivitätskonzentration/g des Hodenkarzinoms lag im Bereich der anderen gemessenen Organe bzw. Gewebe.

Ein Zusammenhang zwischen der Aktivitätskonzentration/g bzw. Gesamtaktivität/Organ und dem Ausmaß der Nekrosen war nicht ersichtlich.

C. DISKUSSION:

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß eine Änderung der histologischen Tumorcharakteristika während mehrerer Passagen auf der Nacktmaus stattfinden kann.

Die histologischen Veränderungen können verschiedenartig ausfallen: Die Malignität des Tumorparenchyms kann zunehmen, oder das Parenchym kann neue Eigenschaften aufweisen beziehungsweise alte Eigenschaften verlieren. Auch das tumorversorgende Stroma kann Atypien aufweisen, wie vergrößerte Zellkerne und eine überproportionale Volumenzunahme.

Das untersuchte Kolonkarzinom wies sowohl Veränderungen des Parenchyms als auch des Stromas auf.

Wie aus dem in der Klinik erhobenen pathologischen Befund hervorgeht, handelte es sich bei dem untersuchten Kolonkarzinom um ein muzinproduzierendes Adenokarzinom. Bei den vorliegenden Untersuchungen dagegen stellte sich das Parenchym des Patiententumors, welches in Form von diffus verteilten Zellnestern vorlag, ohne sichtbare Muzinproduktion dar.

Nach der Transplantation auf die Nacktmaus wies der Ursprungstumor zwei histologisch unterschiedliche Anteile auf. Während ein Anteil einen kleinzystischen Charakter ohne erkennbare Muzinproduktion besitzt, besteht der andere aus stark muzinproduzierenden Strukturen, großzystischer bis bandartiger Form (Abb. 9). In der ersten Passage ergibt sich ein modifizierter histopathologischer Befund. Von den vier untersuchten Tumoren der ersten Passage, wies nur einer eine kleinzystische muzinarmer Struktur auf, während drei der Tumore einen großzystischen muzinreichen Charakter besaßen. Ab der zweiten Passage wurden nur schleimproduzierende Kolonkarzinome gefunden.

Für das Auftreten zweier unterschiedlicher histologischer Anteile innerhalb eines Tumors sind folgende Erklärungen möglich:

1) Der Patiententumor enthielt stark muzinproduzierende Zellen, die in der hier transplantierten Gewebsprobe in geringer Zahl vorhanden waren. Diese Zellen, die in ihrem Wachstum durch die Transplantation in fremde Umgebung weniger betroffen wurden, zeigten ein so rasches Wachstum, daß sie bereits im Ursprungstumor trotz ihrer geringen Anfangszahl zwei Drittel der Tumorzellmasse ausmachten.

2) Durch die Transplantation des tumorösen Gewebes in eine andere Spezies kam es durch unbekannte Faktoren zu einer Genmutation, die bewirkte, daß eine oder mehrere Zellen die Fähigkeit zur Muzinproduktion wiedergewonnen haben. Diese erwiesen sich im Wirt als besonders lebensfähig, und es kam zu einer rapiden Vermehrung (Klon- und Selektionstheorie)(Fialkow 1979).

3) Durch Fusion mit murinen Stromazellen und darauf folgende Genvermischung und Ausschaltung bestimmter für Muzinbildung verantwortlicher Gensequenzen entstanden Zellen, die dem humanen Milieu besonders gut angepaßt waren. Es schließt sich ein selektiver Verlust vieler speziesspezifischer Genanteile an (Goldenberg et al., 1974).

4) Da jedoch in diesem Fall von der Klinik ein Gallertkarzinom diagnostiziert wurde aber die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Anteile des Patiententumors keine sichtbare Muzinproduktion aufwiesen, kann von einer originären Zweiteilung evtl. sogar einer Mehrteilung des Parenchyms ausgegangen werden. Für die Transplantation auf Nacktmäuse wurde nur ein kleiner Tumoranteil von der Klinik zur Verfügung gestellt. So ist es durchaus möglich daß der transplantierte Anteil zum größeren Teil aus muzinarmen Zellen bestand. Der größere Tumoranteil, welcher der Klinik zur Erhebung des pathologischen Befundes zur Verfügung stand, enthielt vermehrt wiederum die muzin-

produzierenden Anteile. Dieser Anteil, obwohl in den transplantierten Teilen unterrepräsentiert, erwies sich in der Nacktmaus als überlebensfähiger.

Die Aufteilung der histologischen Gewebearten auf verschiedene Tumoren wird durch die Transplantationstechnik erklärbar: Es werden keine Zellsuspension, sondern einzelne Tumorstücke zur Transplantation verwendet. Sie führten dazu, daß einer dieser transplantierten Teile nur die muzinarmen Zellen enthielt und sich zu einem homogenen muzinarmen Adenokarzinom entwickelte. Andere der transplantierten Teile bestanden aus stark muzinproduzierendem Gewebe. Für die Etablierung der zweiten Passage wurden Transplantationstücke aus einem homogenen muzinreichen Tumor gewonnen.

Das Hodenkarzinom wies im Laufe der Passagen geringgradigere Parenchymveränderungen auf. Während im Ursprungstumor noch eine perlschnurartige Aneinanderreihung der Parenchymzellen deutlich war, bestand in der dritten Passage das Parenchym bereits aus dicht gedrängten, willkürlich aneinander gereihten Zellen. Diese Entdifferenzierung des histologischen Gewebes wurde bereits von verschiedenen Autoren beobachtet und als eine Zunahme der Malignität interpretiert (Hajdu et al., 1978, Reid et al., 1978). In der Tat wies dieser Tumor während der Passagen ein immer rascheres Wachstum auf. Für die Abnahme der Gewebsdifferenzierung kommen Ursachen in Betracht, die z.T. auch schon oben erwähnt wurden:

- lokal unterschiedliche Durchblutung der Wirtstieroberfläche (Auerbach et al., 1978)
- unterschiedliche Nervendichte des Transplantationsortes
- schwankende genetische Stabilität der Tumorzellen
- Selektion der Tumorzellen auf Grund ihrer Anpassungsfähigkeit und/oder Wachstumsrate (Cairns et al., 1975)

In dem hier beschriebenen Fall ist eine Selektion auf Grund der Anpassung der Tumorparenchymzellen an das Wirtstier anzunehmen. Da der Transplantationsort immer beibehalten wurde und die Entdifferenzierung des Parenchyms allmählich erfolgte, ist eine plötzliche Mutation unwahrscheinlich.

Diese Ergebnisse zeigen nicht nur die Einwirkungen unbekannter Faktoren auf humane transplantierte Tumoren, sondern auch die Möglichkeit, daß bestimmte Strukturen zufällig bevorzugt werden können.

Die weiterhin untersuchten Mamma und Magenkarzinome wiesen keine Veränderungen der Parenchymhistologie auf.

Bereits beim Kolonkarzinom traten neben Veränderungen im Parenchymbereich auch Atypien im murinen Stroma auf.

Während das sonst angetroffene Stroma langgestreckte Zellkerne besaß und als relativ dünne Zelllage in das Parenchym zog, weist das atypische Bindegewebe eine veränderte Histologie auf.

Im Zentrum des Kolonkarzinoms lag ein großvolumiger Stromabereich, der langgestreckte, dicht gedrängte Zellkerne besaß. Ein Teil dieser Zellen reagiert mit Ma-10-11, einem gegen das menschliche Gewebe gerichteten monoklonalen Antikörper.

Tumorstroma Atypien mit zum Teil sogar nachgewiesener maligner Potenz wurden schon von anderen Autoren beobachtet. Goldenberg und Pavia stellten in einem 4 Jahre lang eingefrorenen und danach wiederaufgetauten Adenokarzinom eine starke Vermehrung der mesenchymalen Komponente fest (Goldenberg et al., 1981). Staab et al., 1983 haben transformierte Fibroblasten aus humanen Xenotransplantaten gewonnen und selektiv auf Nacktmäuse übertragen. Diese entwickelten sich zu einem selbständigen Sarkom.

In dem hier untersuchten Kolonkarzinom wies das stark vermehrte, murine Bindegewebe eine Expression humaner bzw. humananaloger Antigene auf. Eine gleichartige Beschreibung

konnte in der zur Verfügung stehenden Literatur nicht gefunden werden.

Auch beim Hodenkarzinom traten Stromaatypien auf. Besonders deutlich waren sie am Ursprungstumor ausgeprägt. Das Stroma mit großkernigen, dichtgepackten Zellen schien auf einer Seite das Tumorparenchym richtiggehend zu verdrängen. Das veränderte Bindegewebe kann jedoch auch von Strängen des sonst vorkommenden Bindegewebes durchzogen sein, wie das an einer der untersuchten Mammakarzinompassagen beobachtet werden konnte. Das Magenkarzinom wies in den untersuchten Passagen keine Stromaveränderungen auf.

Die für die Veränderung des Tumorstromas verantwortlichen Ursachen sind noch nicht ausreichend erforscht. Folgende Möglichkeiten seien aufgezählt:

1) Angeregt durch unbekannte äußere Faktoren (z.B. chemische/physikalische Einflüsse) oder Faktoren, die von den Tumorzellen freigesetzt werden, kommt es in den Kernen zur Expression bestimmter Gensequenzen (Proto-onkogene) und damit eventuell zu einer Veränderung der Zelloberflächenantigene (v. d. Hooff et al., 1986).

2) Onkogene Viren übertragen bestimmte Gensequenzen auf die murinen Bindegewebszellen, die im Kern eingebaut werden und später zu einem malignen Phänotyp führen können (Shih et al., 1981).

3) Ferner könnten durch Zellfusion zwischen Parenchym- und Stromazellen Zellhybride entstehen, die bald selektiv die meisten Gene des einen Elternteiles wieder verlieren. Wird durch die Nager/Mensch-Fusion die Lebensfähigkeit der Zelle beeinträchtigt, so geht die Hälfte der Chromosomen, offensichtlich bevorzugt der humane Anteil verloren, wobei jedoch die "neue" Zelle unter anderem die Eigenschaft des ungehemmten Wachstums beibehält (Goldenberg et al., 1974 u. 1981, Huebner et al., 1979, Staab et al., 1983)

4) Tumoren enthielten bereits entartete Fibroblasten (Goldenberg et al., 1982).

Bei einer Bewertung der immunhistochemischen Methode muß auf das Problem der Kreuzreaktion und der falsch positiven Reaktion eingegangen werden.

Bei immunhistochemischen Untersuchung mit Anti-Maus-IgG Antikörpern stellten sich das Bindegewebe und, bei stärkerer Vergrößerung deutlich erkennbar, auch die Zwischenzellräume des Parenchyms bzw. die Parenchymzellmembranen positiv dar. Eine Erklärung dafür wäre, daß die auf dem Bindegewebe exprimierten Epitope teilweise mit den Paratopen der für den Maus-Immunglobulin Nachweis verwendeten Antikörper übereinstimmen. Dies ist durchaus wahrscheinlich, denn die verwendeten Anti-Maus-IgG Antikörper sind speziesspezifisch hoch gereinigt. So liegen die Kreuzreaktionen mit anderen Spezies weit unter 1%. Kreuzreaktionen innerhalb der Spezies liegen wesentlich höher.

Die leicht positive Färbung des Parenchyms ist wahrscheinlich auf eine Kreuzreaktion des Anti-Maus-IgG Antikörpers mit murinem Fibrin zurückzuführen. Nach den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Dvorak werden die Tumoren nach der Transplantation von einer bandartigen Schicht eines Fibringels umgeben. Dies gilt nicht nur für die Tumorperipherie sondern es kommt auch innerhalb des Tumorparenchyms zwischen den Zellen zu Fibrinablagerungen. Als Ursache werden die vom Tumor sezernierten Stoffe angesehen die zu einer höheren Gefäßpermeabilität führen und so zu einem vermehrten Austritt von Plasmaproteinen und Fibrinogen wobei letzteres als Fibrin um den Tumor und auch um die einzelnen Tumorzellen selbst abgelagert wird.

Das deponierte Fibrin wird innerhalb einiger Tage vom Bindegewebe ersetzt. Vom Ausmaß der Fibrinablagerung hängt auch das Ausmaß der "Desmoplasie", d. h. der Stromareaktion, ab. Die "Kreuzreaktion" mit Anti-Maus IgG

Antikörper, die nur in der Nähe des blutgefäßführenden Stromas auftritt, kann als eine Bestätigung für die Anwesenheit des murinen Fibrins innerhalb des Tumorparenchyms angesehen werden. Auch für die Entstehung des großvolumigen Bindegewebsteils innerhalb des Kolonkarzinoms und die verschiedentlich auftretenden Tumorkapselverdickungen wäre die Fibrinablagerung und nachfolgende Kollagenisierung eine zusätzliche Erklärung (Dvorak et al., 1981 u. 1984, Form et al., 1984).

Bei allen untersuchten Tumoren traten positive Reaktionen auf, die nicht auf Antigen-Antikörperreaktionen zurückzuführen sind. Diese Farbreaktionen traten auch nach dem alleinigen Auftragen vom AEC-Farbsubstrat auf. Diese positive Färbung entsteht durch die Reaktion des Farbsubstrats als Elektronendonator mit endogenen Peroxidasen der Zelllysosomen phagozytierender Zellen (Makrophagen) oder der Erythrozyten. Wenn die Reaktionen der endogenen Peroxidase die Auswertung der Ergebnisse behindern, so kann diese unerwünschte Reaktion durch ein Methanol-Wasserstoffsuperoxid-Bad unterbunden werden (DeLellis et al. 1979).

Die Verwendung eines monoklonalen HLA-Antikörpers aus einer Ratte (Milzzellen)/Maus (Myelomzellen) Fusion bietet bei der Speziesunterscheidung Mensch/Maus große Vorteile gegenüber einer Maus/Maus Fusion. Die entstandenen Hybride produzieren Rattenimmunglobuline. Wenn nun bei der indirekten Immunhistochemie als zweiter Antikörper ein speziesspezifisch gereinigter Anti-Ratte IgG Antikörper verwendet wird, so sind Kreuzreaktionen mit murinen Immunglobulinen und murinen Bindegewebe praktisch ausgeschlossen. Es ist allgemein von großer Bedeutung, daß monoklonale Antikörper, die zur Speziesdifferenzierung eingesetzt werden, einer dritten, nicht im untersuchten Gewebe vorhandenen Spezies angehören.

Die Speziesdifferenzierung mit Bisbenzimid weist den Vorteil der raschen Durchführbarkeit auf. Die Nachteile dieses Verfahrens sind jedoch deutlich:

Um die Spezieszugehörigkeit des Kernes eindeutig bestimmen zu können, ist eine gute Schnittführung notwendig. Die randständig getroffenen Zellkerne können nicht exakt identifiziert werden. Auch die Histologie kann man auf Grund des zweifarbigen Schnittes schlecht beurteilen. Weiterhin lassen sich diese Präparate nicht lange aufbewahren. Bereits nach 1-2 Wochen ist die Differenzierung human bzw. murin nicht mehr möglich.

Die szintigraphische Tumordarstellung mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehört die Spezifität des Antikörpers für bestimmte, vorwiegend im Tumor oder nur im Tumor in hoher Konzentration vorkommende Antigene.

Die Tumurvaskularisation spielt für die Bioverfügbarkeit der applizierten Antikörper eine wichtige Rolle.

Die Plasmahalbwertszeit des verwendeten Antikörpers wird durch dessen Fc-Fragment bestimmt (Senekowitsch et al., 1987). Nach seiner Abspaltung mit Hilfe proteolytischer Enzyme erreichen die so entstandenen Fragmente (Fab bzw. $F(ab')_2$) durch die verbesserte Diffusionsfähigkeit zwar rascher die entsprechenden Tumorantigene, jedoch ist die Bindung an das Antigen schwächer ausgeprägt als bei einem intakten Antikörper. Durch die rasche Nierenausscheidung der Fragmente wird zwar die unerwünschte Aktivitätskonzentration im Blut rasch vermindert, aber es werden niedrigere Aktivitätskonzentrationen im Tumor erreicht als für die Szintigraphie und Therapie in vielen Fällen wünschenswert wäre.

In den hier durchgeführten Versuchen erwiesen sich intakte Antikörper als besser geeignet, da neben den Auswirkungen der Gewebszusammensetzung auf die immunszintigraphische Darstellung und Biokinetik versucht werden sollte, ob ein direkter immunhistochemischer Nachweis des i.v. (in vivo) applizierten Antikörpers im Tumor möglich ist. Für den nicht gelungenen Nachweis der i.v. applizierten MAK können mehrere Ursachen verantwortlich sein:

- zu niedrige Konzentration des gebundenen Antikörpers im Tumor
- durch die Azetonfixierung erfolgte Antikörperzerstörung oder Ablösung von seinem Antigen
- Da der verwendete MAK aus einer Maus/Maus Fusion stammt, wurde als zweiter Antikörper ein HRP-konjugierter Antikörper gegen murines IgG verwendet. Dieser wies eine so hohe Kreuzreaktion mit murinem Gewebe auf, so, daß eine hohe Konzentration des gesuchten gebundenen Ak nötig wäre, um diesen im kreuzreagierenden Gewebe eindeutig nachzuweisen.

Bestätigt werden konnte der Zusammenhang zwischen dem Anteil der Aktivität im Gesamttumor an der Ganzkörperretention und der immunszintigraphischen Darstellung. Die Gesamtaktivität im Tumor ist von zwei Parametern abhängig: vom Gewicht des Tumors und Prozent der applizierten Aktivität/g Tumorgewebe. Bei guter immunszintigraphischer Darstellung des Tumors ist der Anteil der im Tumor retinierten Aktivität an der Ganzkörperretention relativ hoch im Gegensatz zu einer nicht gelungenen immunszintigraphischen Darstellung. Daraus folgt, daß sich ein Tumor mit geringem Gewicht, aber hoher Aktivitätskonzentration und somit einem hohen Anteil an der Ganzkörperretention sich genauso gut darstellt, wie ein großer Tumor mit geringer Aktivitätskonzentration (Epenetos et al., 1982, Hagan et al., 1986, Pimm et al., 1982).

Je höher die spezifische Antigenkonzentration im Tumor liegt (ideal über 10^6 Antigenbindungsstellen/Tumorzelle), um so höher liegt der prozentuale Anteil der Aktivität im Tumor an der Ganzkörperretention und umso höher ist die Qualität der immunszintigraphischen Darstellung. Dies führt nach 4-5 Tagen zu einem hohen Tumor/Blut Quotienten und somit zu einer verringerten Strahlenbelastung des Organismus.

In den durchgeführten Versuchen erwies sich der Tumak Antikörper als hochspezifisch. Nach 5 Tagen waren von der im Ganzkörper zu diesem Zeitpunkt noch retinierten Aktivität bis zu 90% im Tumorgewebe lokalisiert. Entsprechend gut stellte sich der Tumor im Szintigramm dar. Der Anti-CEA Antikörper dagegen war zu diesem Zeitpunkt maximal zu 17% im Tumor lokalisiert.

In der Tabelle 5 (I 131 Tumak Applikation) übersteigt beim Tier Nr. 13 der Anteil der Tumorgesamtaktivität an der Ganzkörperretention den 100% Wert. Dieses Ergebnis ist insofern erklärbar, als die Aktivitätsmessung des Tumors und die Ganzkörpermessung mit unterschiedlichen Geräten durchgeführt wurden.

Der wichtige Beitrag der Antikörperspezifität an der Qualität der immunszintigraphischen Darstellung ergibt sich bereits aus den oben stehenden Ausführungen und Zitaten. Zu einer anderen Bewertung der Antikörperspezifität gelangt nur Mann et al., 1984. Dieser hält allein die Größe des Tumors für ausschlaggebend. Eine Tumordarstellung sei auch mit unspezifischen Antikörpern möglich, wobei bei der Verwendung spezifischer Antikörper nur eine geringfügig höhere Aktivitätskonzentration im Tumor zu erkennen sei.

Da es bei keinem der szintigrafierten Tumoren zu auffälligen histologischen Veränderungen infolge oder während der vorhergegangenen Passagen kam, konnte deren Auswirkung auf die Antikörperanreicherung im Tumor nicht beurteilt werden. Die bei einigen Tumoren auftretenden Bindegewebsatypien waren zu geringfügig, um die Ergebnisse entscheidend zu beeinflussen. Die gering- bis mittelgradigen Nekrosen scheinen ebenfalls in diesem Fall keinen Einfluß auf die immunszintigraphische Darstellbarkeit zu haben. Hagan et al., 1986, vermuten, daß in kleineren, gut durchbluteten und nicht nekrotischen Tumoren die Dejodierung schneller abläuft als dieses bei den größeren hypoxischen und nekrotischen Tumoren der Fall ist. Eine niedrigere Aktivitätskonzentration bei nekrotischen Tumoren wurde bereits früher festgestellt. Dies wurde dadurch erklärt, daß sich die radioaktiv markierten Antikörper nur in der nicht nekrotischen Rindenzone anreichern, was mit Hilfe der Autoradiographie bestätigt werden konnte (Moshakis et al., 1981, Pimm et al., 1982).

Wichtig für die Biokinetik und die immunszintigraphische Darstellung ist also auch der Metabolismus der radioaktiv markierten Antikörper. Es wurden bereits Dejodierungsraten von bis zu 80% innerhalb der ersten 24 h festgestellt (Godwin et al., 1985). Die Dejodierungsrate ist auch abhängig von der Markierungsmethode, wie der Chloramin-T Methode, der enzymatischen Jodierung mit der Lactoperoxidase oder der Jodogen Methode. Die letztere erwies sich auf Grund einfacher Durchführbarkeit, guter Jodeinbaurate und geringer Proteinschädigung (somit geringster Einfluß auf die Immunreaktivität) als die geeignetste (Keenan et al., 1985).

Aus diesem Grund muß die gemessene Aktivitätskonzentration nicht mit der tatsächlich angelagerten Antikörperkonzentration übereinstimmen. Bei zu hoher Jodidabspaltung durch

die körpereigenen Dejodasen kann der gemessene Tumor/Blut-quotient sinken, was wiederum die szintigraphische Darstellbarkeit beeinflusst.

Das sich aus der Ganzkörpermessung ergebende Retentionverhalten (s. D. 2.6.) wurde bisher in der Literatur nicht näher beschrieben, da ein Kleintierganzkörperzähler zur Zeit nur in der Abt. f. Nuklearbiologie der GSF auf diese Weise eingesetzt wird.

Eigentlich würde man eine niedrigere Retentionsrate bei negativen Tumortieren und den Kontrolltieren erwarten, da im Tumor eine niedrigere Antigenkonzentration zur Antikörperbindung zur Verfügung steht. Eine mögliche Erklärung der hier festgestellten entgegengesetzten Ergebnisse wäre, daß durch den hohen Tumorstoffwechsel und die gleichzeitig hohe Antikörperbindung bei szintigraphisch positiven Tumoren, die Dejodierungsrate erhöht wird (Hagan et al. 1986). Dieses würde die höhere Retentionsrate bei Tumortieren mit geringer Antigenexpression und bei tumorfreien Kontrolltieren erklären.

In dieser Arbeit wird auf die Notwendigkeit der routinemäßigen Überprüfung der Gewebsstrukturen bei Xenotransplantaten hingewiesen. Vor Beginn jeglicher Versuche sollte sich das Transplantat in allen Passagen als konstant erweisen. Bei den hier durchgeführten Beobachtungen scheint die größte histologische Schwankung während der ersten Passagen aufzutreten. Eine eventuell völlige Verdrängung des Parenchyms durch Stroma kann somit rechtzeitig entdeckt werden.

Weitere Untersuchungen zur Korrelation zwischen histologischem Bild und immunszintigraphischer Darstellung mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern sollten durchgeführt werden.

Zusammenfassung:

Immunhistochemische Untersuchungen xenotransplantierte
humaner Adenokarzinome an Nacktmäusen und Korrelation zur
immunszintigraphischen Darstellung

Humane Karzinome wurden auf Balb/c-nu/nu Mäuse subkutan
transplantiert und über 4 Passagen mit Hilfe der Immunhisto-
chemie und des Farbstoffes Bisbenzimid untersucht. Die bei-
den Methoden führten zu einer erfolgreichen Differenzierung
des humanen Tumorparenchyms von dem murinen versorgenden
Stroma. Als besonders geeignet erwies sich der monoklonale
Antikörper gegen menschliches Gewebe aus einer Ratte/Maus
Fusion.

Es wurden vier Adenokarzinome (Kolonkarzinom, Hodenkarzinom,
Mammakarzinom, Magenkarzinom) untersucht, wobei Atypien des
murinen Bindegewebes und Variationen des Parenchyms (z. B.:
Kolonkarzinom - Schleimproduktion) während der ersten 4-5
Passagen gefunden wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch bei thymusaplastischen
Tieren Veränderungen des Tumorcharakters vorkommen, welche
mit Hilfe einer routinemäßigen Untersuchung der einzelnen
Tumore rechtzeitig erfaßt werden können.

Auftretende Veränderungen der Tumorstruktur können auch
Auswirkungen auf die Prüfung diagnostischer und
therapeutischer Verfahren besitzen. Dies wurde anhand der
Immunszintigraphischen Tumordarstellung und der damit
gekoppelten Biokinetik und Ganzkörperretention mit Hilfe
radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper untersucht.

Da in der untersuchten Passage des Mamma-, Hoden- und Kolonkarzinoms keine größeren morphologischen Abweichungen auftraten, wurde besonders auf die Zusammenhänge zwischen Aktivitätskonzentrationen in den Normalgeweben und im Tumor, der Tumorgroße und der Ganzkörperretention in Hinblick auf die immunszintigraphische Darstellung eingegangen.

Summary:

Immunohistochemical investigations of xenotransplanted human adenocarcinomas on nude mice; correlation to radioimaging

Human carcinomas were subcutaneously grafted to nude mice (Balb/c-nu/nu) and were investigated in four passages by immunohistochemical methods and by the fluorochrome bisbenzimid. In this way there could be observed a successful differentiation between the nourishing murine stroma and the human tumor parenchym. Especially the use of a monoclonal antibody (rat/mouse fusion) directed against human tissue turned out to be a suitable method.

Four adenocarcinomas were tested: colon-, mamma-, stomach- and testicle carcinoma. During the first four passages atypical parts of murine connective tissue and some changes in the human parenchyma could be seen.

These results demonstrate that also in nude mice variations of the transplanted tumor material could happen. They could be detected in time with a routine immunohistochemical test. The consequences of tumor morphological variations for the development of therapeutic and diagnostic tools were studied with the help of radioimaging by external scintigraphy. Furthermore the biodistribution, tumoruptake and the whole body counting were studied by means of radionuclid marked monoclonal antibodies.

The morphological variations of the passages of mammary, testicle and colon carcinomas were not big enough to influence the results in a certain way. Therefore especially the relation between the activity uptake in the tissue, the size of the tumor and the whole body uptake was studied in view of immunoscintigraphy.

G. LITERATURVERZEICHNIS:

Anderer, F. A.:

In vivo induction of neoplastic growth in nude mouse connective tissue adjacent to xenografted human tumors. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 106, 27-35 (1983)

Auerbach, R., Auerbach, W.:

Regional differences in the growth of normal and neoplastic cells. Science 215, 127-134 (1982)

Auerbach, R., Morrissey, L. W., Kubai, L., Sidky, Y.A.:

Regional differences in tumor growth: Studies of the vascular system. Int. J. Cancer 22, 40-46 (1978a)

Auerbach, R., Morrissey, L. W., Sidky, Y.A.:

Regional differences in the incidence and growth of mouse tumors following intradermal or subcutaneous inoculation. Cancer Res. 38, 1739-1744 (1978b)

Auerbach, R., Sidky, Y. A.:

Nature of the stimulus leading to lymphocyte-induced angiogenesis. J. Immunology 123 (1979)

Avrameas, S.:

Indirect immunoenzyme techniques for the intracellular detection of antigens. Immunochemistry 6, 825-831 (1969)

Ballou, B., Levine, G., Hakala, T. H., Solter, D.:

Tumor location detected with radioactivity labeled monoclonal antibody and external scintigraphy. Science 206, 844-846 (1979)

- Ballou, B., Reiland, J., Levine, J., Knowles, B.,
Hakala, T. R.: Tumor location using F(ab')₂
from a monoclonal IgM antibody. Pharmacokinetics. J.
Nucl. Med. 26, 283-292 (1985)
- Bastert, G., Fortmeyer, H. P., Eichholz, H., Michel, R.,
Huck, R., Schmidt-Matthiesen, H.: Human breast cancer
in thymusaplastic nude mice. In: Thymusaplastic Nude
Mice and Rats in Clinical Oncology (Eds: Bastert, G.
et al.). Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag,
157-182 (1981)
- Baum, R. P., Hör, G:
Immunszintigraphie: Entwicklung, derzeitiger Stand
und Ausblick. Nucl.-Med. 25, 157-161 (1986)
- Begent, R. H. J., Stanway, G., Jones, K. D.,
Bagshawe, K., D., Searle, F., Jewkes, R. F., Vernon,
P.: Radioimmunolocalization of tumours by external
scintigraphy after administration of ¹³¹I antibody
to human chorionic gonadotrophin: preliminary commu-
nication. J. Royal Soc. Med. 73, 624-630 (1980)
- Berg, D.: mündliche Mitteilung, 1985
- Biersack, H. J., Bockisch, A., Oehr, P., Knoblich,
A., Hartlapp, J., Biltz, H., Jaeger, N., Bellmann,
O., Vogel, J., Björklund, B., Taylor-Papadimitiou,
J., Winkler, C.: Clinical results of immunoscinti-
graphy in a variety of malignant tumors with special
reference to immunohistochemistry. Nucl.-Med. 25,
167-171 (1986)

- Bosman, F. T., Cramer-Knijmenburg, G., van Bergen
Henegouw, J.: Efficiency and sensitivity of indirect
immunoperoxidase methods. *Histochemistry* 77, 185-194
(1983)
- Burns, J., Hambridge, M., Taylor, C. R.:
Intracellular immunoglobulins: A comparative study on
three standard tissue processing methods using horse-
radish peroxidase and fluorochrom conjugates. *J.*
Clin. Path. 27, 548-557 (1974)
- Cairns, J.:
Mutation selection and the natural history of cancer.
Nature 255, 197-200 (1975)
- Chatal, J., Saccavini, J., Fumoleau, P., Douillard,
J., Curtet, Ch., Kremer, M., Le Mevet, B., Koprowski,
H.: Immunoscintigraphy of colon carcinoma. *J. Nucl.*
Med. 25, 307-314 (1984)
- Chen, T. R.:
In situ detection of mycoplasma contamination in cell
cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp.*
Cell Res. 104, 255-262 (1977)
- Clark, Ch., A., Downs, E. C., Primus, F. J.:
An unlabeled antibody method using glucose oxidase-
-antiglucose oxidase complexes (GAG). *J. Histochem.*
Cytochem. 30(1), 27-34 (1982)
- Coons, A., H.:
Histochemistry with labeled antibody. In: *Internatio-*
nal Review of Cytology (Eds.: Bourne, G. H.,
Danielli, J. F.). New York: Academic Press, 1-23
(1956)

Cunha, G. R., Vanderslice, K. D.:

Identification in histological sections of species origin of cells from mouse, rat and human. Stain Technology 59(1), 7-12 (1984)

Curran, R. C., Gregory, J.:

Demonstration of immunoglobulin in cryostat and paraffin sections of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. J. Clin. Pathol. 31, 974-983 (1978)

DeLand, F. H., Kim, E. E., Simmons, G.,

Goldenberg, D. M.: Imaging approach in radioimmunodetection. Cancer Res. 40, 3046-3049 (1980)

DeLellis, R. A., Sternberger, L. A., Mann, R. B.,

Banks, P. M., Nakane, P. K.: Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Am. J. Clin. Pathol. 71, 483-488 (1979)

Denk, H., Tappeiner, G., Eckerstorfer, R., Holzner,

J. H.: Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and extragastrointestinal tumors and its relationship to tumor-cell differentiation. Int. J. Cancer 10, 262-272 (1972)

De Sousa, M. A. B., Parrott, D. M. V.,

Pantelouris, E. M.: The lymphoid tissue in mice with congenital aplasia of the thymus. Clin. Exp. Immunol. 4, 637-644 (1969)

Dillman, R. O., Beauregard, J. C., Sobol, R. E.,
Royston, Y., Bartholemew, R. M., Hagan, P. S.,
Halpern, S. E.: Lack of radioimmuno-detection and
complications associated with monoclonal anticarcino-
embryonic antigen antibody cross-reactivity with an
antigen on circulating cells. Cancer Res. 44,
2213-2218 (1984)

Duran-Reynals, F.:

Studies on the localization of dyes and foreign pro-
teins in normal and malignant tissues. Am. J. Cancer
35(1), 98-106 (1939)

Dvorak, H. F., Dickersin, G. R., Dvorak, A. M.,

Manseau, E. J., Pyne, K.: Human breast carcinoma: fi-
brin deposits and desmoplasia. Inflammatory cell type
and distribution. Mikrovaskulature and infarction. J.
Natl. Cancer Inst. 335-345 (1981)

Dvorak, H. F., Form, D. M., Manseau, E. J., Smith, B.

D.: Pathogenesis of desmoplasia.

I. Immunofluorescence identification and localization
of some structural proteins of line 1 and line 10
guinea pig tumors and of healing wounds. J. Natl.
Cancer Inst. 73, 1195-1201 (1984)

Ehrlich, P., Apolant, H.:

Beobachtungen über maligne Mäusetumoren. Berliner
Klin. Wochenschrift 28, 871-874 (1905)

Ehrlich, P.:

Experimentelle Studien an Mäusetumoren. Internatio-
nale Konferenz für Krebsforschung, Heidelberg, Sept.
1906

- Epenetos, A. A., Nimmon, C. C., Arklie, J.,
Elliott, A. T., Hawkins, L. A., Knowles, W. W.,
Britton, K. E., Bodmer, W. F.: Detection of human
cancer in an animal model using radio-labeled tumour-
associated monoclonal antibodies. Br. J. Cancer 46,
1-8 (1982)
- Farr, A. G., Nakane, P. K.:
Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies:
a brief review. J. Immunol. Meth. 47, 129-144 (1981)
- Fialkow, P. J.:
Clonal origin of human tumors. Ann. Rev. Med. 30,
135-143 (1979).
- Flanagan, S. P.:
"Nude" a new hairless gene with pleiotropic effects
in the mouse. Genet. Res. Comm. 8, 295-309 (1966)
- Fogh, J., Bean, M. A., Brüggen, J., Fogh, H., Fogh,
J. M., Hammar, S. P., Kodera, Y., Loveless, J. D.,
Sorg, C., Wright, W. C.: Comparision of a human tumor
cell line before and after growth in the nude mouse.
In: The Nude Mouse in Experimental and Clinical
Research (Eds.: Fogh, J., Giovanella, B., C.). New
York: Academic Press, 215-233 (1978)
- Folkman, J., Cotran, R.:
Relation of vascular proliferation to tumor growth.
Intern. Rev. Exp. Path. 16, 207-248 (1976)
- Folkman, J.:
Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. New
Engl. J. Med. 285(21), 1182-1186 (1971)

Form, D. M., VanDeWater, L., Dvorak, H. F., Smith, B.

D.: Pathogenesis of Tumor Desmoplasia.

II. Collagens synthesized by line 1 and line 10 guinea pig carcinoma cells and by syngeneic fibroblasts in vitro. J. Natl. Cancer Inst. 73, 1207-1214 (1984)

Fortmeyer, H. P.:

Thymusaplastische Maus (nu/nu), thymusaplastische Ratte - Haltung, Zucht, Versuchsmodelle. Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag (1981)

Gimbrone, M. A., Cotran, R. S., Leapman, S. B.,

Folkman, J.: Tumor growth and neovascularisation: An experimental model using the rabbit cornea. J. Nat. Cancer Inst. 52(2), 413-427 (1974)

Giovanella, B. C., Fogh, J.:

Present and future trends in investigations with the nude mouse as a recipient of human tumor transplants. In: The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research (Eds.: Fogh, J., Giovanella, B., C.). New York: Academic Press, 281-312 (1978)

Gold, P., Freedman, S. O.:

Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J. Exp. Med. 122, 467-481 (1965)

Goldenberg, D. M., DeLand, F. H., Kim, E.:

Use of radiolabeled antibodies to CEA for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. N. Engl. J. Med. 298, 1384-1388 (1978)

- Goldenberg, D. M., Kim, E. E., Bennett, S. J.,
Nelson, M. O., DeLand, F. H.: Carcinoembryonic anti-
gen radioimmuno-detection in the evaluation of colo-
rectal cancer and in the detection of occult neo-
plasm. *Gastroenterology* 84, 524-532 (1983)
- Goldenberg, D.M., Pavia, R. A.:
In vivo horizontal oncogenesis by a human tumor in
nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2389-2392
(1982)
- Goldenberg, D. M., Pavia, R. A., Tsao, M. C.:
In vivo hybridization of human tumour and normal
hamster cells. *Nature* 250, 649-651 (1974)
- Goldenberg, D.M., Pavia, R. A.:
Malignant potential of murine stromal cells after
transplantation of human tumors into nude mice.
Science 212, 65-67 (1981)
- Goldenberg, D. M., Preston, D. F., Primus, F. J.,
Hansen, H. J.: Photoscan localization of GW-39 tumors
in hamster using radiolabeled anticarcinoembryonic
antigen Immunoglobulin G. *Cancer Res.* 34, 1-9 (1974)
- Graem, N.:
Epidermal changes following application of 7,12-Dime-
thylbenz(a)anthracene and 12-O-Tetradecanoylphor-
bol-13-acetate to human skin transplanted to nude
mice studied with histological species markers.
Cancer Research 46,2/8-284 (1986)4.17.

Graem, N., Dabelsteen, E., Tommerup, N.:

Blood group substances, T6 Antigen and heterochromatin pattern as species markers in the nude mouse/human skin model. *Expl. Cell Biol.* 52, 251-259 (1984)

Graham, R. C., Karnovsky, M. J.:

The early stages of absorption of injected horse radish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14, 291-302 (1966)

Granowska, M., Shepard, J., Britton, K. E.:

Ovarian cancer: Diagnosis using ^{123}I monoclonal antibody in comparison with surgical findings. *Nucl. Med. Comm.* 5, 485-420 (1984)

Greenblatt, M., Shubik, P.:

Tumor angiogenesis: Transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Nat. Cancer Inst.* 41, 111-124 (1968)

Gross, R., Schmidt, C. G.:

Klinische Onkologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (1985)

Haaijman, J. J., Deen, Kröse, C. J. M., Zijlstra,

J. J., Coolen, J., Radl, J.: Monoclonal antibodies in immunocytology: A jungle full of pitfalls. *Immunol. Today* 5, 56-58 (1984)

Hagan, P. L., Halpern, S. E., Dillman, R. O.,

Shawler, D. L., Johnson, D. E., Chen, A., Krishnan, L., Frincke, J., Bartholomew, M., David, G. S., Carlo, D.: Tumor size: Effect on monoclonal antibody uptake in tumor models. *J. Nucl. Med.* 27, 422-427 (1986)

Hajdu, S. I., Fogh, J.:

The nude mouse as a diagnostic tool in human tumor cell research. In: The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research (Eds.: Fogh, J., Giovanella, B. C.). New York: Academic Press, 235-265 (1978)

Hajdu, S. I., Lemos, L. B., Kozakewich, H., Helson, L., Beattie, E. J.: Growth pattern and differentiation of human soft tissue sarcomas in nude mice. Cancer 47, 90-98, (1981)

Hanna, N., Fidler, I. J.:

Expression of metastatic potential of allogenic and xenogeneic neoplasms in young nude mice. Cancer Res. 41, 438-444 (1981)

Holub, M., Rossmann, P., Mandi, B.:

The dysgenetic thymic complex of the nude mouse. Folia Biol. 24, 416-418 (1978)

Hooff van den, A.:

Connective tissue as an active participant in the process of malignant growth. Anticancer Res. 6, 775-780 (1986)

Huebner, R. J., Fish, D. C., Djurickovic, D.,

Trimmer, R. W., Bare, A. L., Bare, R. M., Smith, G. T.: Induction of rat sarcomas in rats treated with antithymocyte sera after transplantation of human cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1793-1794 (1979)

Isaacson, J. H., Cattanaach, B. M.:

Report. Mouse News Letters 27, 31 (1962)

- Jirtle, R., Clifton, K. H., Rankin, J. H. G.:
Measurement of mammary tumor blood flow in unanesthetized rats. J. Natl. Cancer Inst. 60, 881-886 (1978)
- Judd, M. A., Britten, K. J. M.:
Tissue preparation for the demonstration of surface antigens by immunoperoxidase techniques. Histochem. J. 14, 747-753 (1982)
- Keenan, A. M., Colcher, D., Larson, S. M., Schlom, J.:
Radioimmunosciintigraphy of human colon cancer xenografts in mice with radioiodinated monoclonal antibody B72.3. J. Nucl. Med. 25, 1197-1203 (1984)
- Keenan, A. M., Harbert, J. C., Larson, S. M.:
Monoclonal antibodies in nuclear medicine. J. Nucl. Med. 26, 531-537 (1985)
- Kessler, D. A., Langer, R. S., Pless, N. A.,
Folkman, J.: Mast cells and tumor angiogenesis. Int. J. Cancer 18, 703-709 (1976)
- Kim, E. E., DeLand, F. H., Nelson, M. O., Benett, S.,
Simmons, G., Alpert, E., Goldenberg, D. M.: Radioimmunodetection of cancer with radiolabeled antibodies to alpha-Fetoprotein. Cancer Res. 40, 3008-3012 (1980)
- Kiessling, R., Haller, O.:
Natural Killer Cells in the mouse: An alternative immune surveillance mechanism? Contemp. Top. Immunobiol. 8, 171-201 (1978)

Köhler, G., Milstein, C.:

Continuous culter of fused cells secreting antibody of predefined specifity. Nature 256, 495-497 (1975)

Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn,

M., Herlyn, D., Fuhrer, P.: Colonrectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. Som. Cell Genetics 5, 957-972 (1979)

Korngold, L., Pressman, D.:

The localization of antilymphosarcoma antibodies in the Murphy lymphosarcoma of the rat. Cancer Res. 14, 96-99 (1954)

Lampert, F., Karsch, P., Goldenberg, D. M.:

Chromosomen von heterolog und homolog transplantierten Human- und Hamstertumoren. Arch. Geschwulstforsch. 32, 309-321 (1968)

Larson, S. M.:

Radiolabeled monoclonal anti-tumor antibodies in diagnosis and therapy. J. Nucl. Med. 26, 538-545 (1985)

Lefkovitz, I.:

The nude mouse in retrospect. In: Proceedings of the Second International Workshop on Nude Mice (Eds. Nomura, T., Ohsawa, N., Tamaoki, N., Fujiwara, K.). Tokyo: University of Tokyo Press, 557-568 (1977)

Lewis, R. E., Johnson, W. W., Cruse, J. M.:

Pitfalls and caveats in the methodology for immunoperoxidase staining in surgical pathologic diagnosis. Surv. Synth. Path. Res. 1, 134-152 (1983)

Lotzova, E., McCredie, K. B.:

Natural Killer Cells in mice and man and their possible biological significance. Cancer Immunol. Immunother. 4, 215-221 (1978)

Mach, J. P., Chatal, J., Lumbroso, J., Buchegger, F., Forni, M., Ritschard, J., Berche, C., Douillard, J., Carrel, S., Herlyn, M., Stepilewski, Z., Koprowski, H.: Tumor localization in patients by radiolabeled monoclonal antibodies against colon carcinoma. Cancer Res. 43, 5593-5600 (1983)

Mach, J. P., Forni, M., Ritschard, J., Buchegger, F., Carrel, S., Widgren, S., Donath, A., Alberto, P.: Use and limitations of radiolabeled anti-CEA antibodies and their fragments for photoscanning detection of human colorectal carcinomas. Oncodev. Biol. Med. 1, 49-69 (1980)

Mach, J. P., Buchegger, F., Forni, M., Ritschard, J., Berche, C., Lumbroso, J. D., Schreyer, M., Girardet, Ch., Accolla, R. S., Carrel, S.: Use of radiolabeled monoclonal anti-CEA antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomoscintigraphy. Immunol. Today 2, 239-249 (1981)

Mann, B. D., Cohen, M. B., Saxton, R. E., Morton, D. L., Benedict, W. F., Korn, E. L., Spolter, L., Graham, L. S., Chiang, C. C., Burk, M. W.: Imaging of human tumor xenografts in nude mice with radiolabeled monoclonal antibodies. Cancer 54, 1318-1327 (1984)

- Maruo, K., Ueyma, Y., Kuwahara, Y., Hioki, K., Saito, M., Nomura, T., Tamaoki, N.: Human tumour xenografts in athymic rats and their age dependence. Br. J. Cancer 45, 786-789 (1982)
- Mason, T. E., Phifer, R. F., Spicer, S. S., Swallow, R. S., Dreskin, R. D.: New immunochemical technique for localizing intracellular tissue antigen. J. Histochem. Cytochem. 17(3), 190 (1969)
- Mason, T. E., Phifer, R. F., Spicer, S. S., Swallow, R. A., Dreskin, R. B.: An Immunoglobuline-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. J. Histochem. Cytochem. 17(9), 563-569 (1969)
- Miwa, M., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Mukojima, T., Ohkura, H., Kawachi, T., Sugimura, T.: Coproduction of carcinoembryonic antigen and alpha-Fetoprotein in transplantable human colon cancer in nude mice. In: Proceedings of the Second International Workshop on Nude Mice (Ed. Nomura, T., Ohsawa, N., Tamaoki, N., Fujiwara, K.). Tokyo: University of Tokyo Press, 436-439 (1977)
- Moser, F. G., Dorman, B. P., Ruddle, F. H.: Mouse-human heterokaryon analysis with a 33258 Hoechst-Giemsa technique. J. Cell Biol. 66, 676-680 (1975)
- Moshakis, V., McIlhinnney, R. A., Raghavan, D., Neville, A. M.: Localization of human tumor xenografts after i.v. administration of radiolabeled monoclonal antibodies. Br. J. Cancer 44, 91-99 (1981)

Müller, H. J.:

A simple fluorescence staining technique for the differentiation of human tissue transplanted into nude mice. *Stain Technology* 51(6), 287-291 (1976)

Nakane, P. K.:

Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 11, 929-931 (1967)

Nakane, P. K., Kawaoi, A.:

Peroxidase-labeled antibody - a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22(12), 1084-1091 (1974)

Nakane, P. K., Pierce, G. P.:

Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.* 33, 307-313 (1967)

Pantelouris, E. M.:

Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370-371 (1968)

Pimm, M. V., Baldwin R. W.:

Quantitative evaluation of the localization of a monoclonal antibody (791T/36) in human osteogenic sarcoma xenografts. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 20, 515-524 (1984)

Pimm., M. V., Embleton, M. J., Perkins, A. C.,

Price, M. R., Robins, R. A., Robinson, G. R.,

Baldwin, R. W.: In vivo localization of anti-osteogenic sarcoma 791T monoclonal antibody in osteogenic sarcoma xenografts. *Int. J. Cancer* 30, 75-85 (1982)

Popescu, N., C., Cioloca, L., Liciu, F., Engut, I.:

A study of some tumours of human origin - I. Europ.
J. Cancer 6, 175-180 (1970)

Povlsen, C. O.:

Heterotransplantation of human gastrointestinal tumors to nude mice. In: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology (Eds: Bastert, G. et al.). Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, 308-315 (1981)

Povlsen, C. O., Visfeldt, J., Rygaard, J., Jensen,

G.: Growth patterns and chromosome constitutions of human malignant tumors after long-term serial transplantation in nude mice. Acta path. microbiol. scand. Sect. A 83, 709-716 (1975)

Prabhakaran, K., Harris, E. B., Kirchheimer, W. F.:

Hairless mice, human leprosy and thymus-derived lymphocytes. Experientia 31, 784-785 (1975)

Pressman, D., Day, D., Blau, M.:

The use of paired labeling in the determination of tumor-localizing antibodies. Cancer Res. 17, 845-850 (1957)

Quinones, J., Mizejewski, G., Beierwaltes, W. H.:

Choriocarcinoma scanning using radiolabeled antibody to chorionic gonadotrophin. J. Nucl. Med. 12, 69-75 (1971)

Rainsbury, R. M.:

The localization of human breast carcinomas by radio-labeled monoclonal antibodies. Br. J. Surg. 71, 805-812 (1984)

Reid, L. C. M., Shin, S.:

Transplantation of heterologous endocrine tumor cells in nude mice. In: The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research (Eds.: Fogh, J., Giovanella, B., C.). New York: Academic Press, 313-348 (1978)

Roch, W. R:

Mast cells and tumor angiogenesis: The tumor- mediated release of an endothelial growth factor from mast cells. Int. J. Cancer 36, 721-728 (1985)

Rygaard, J.:

Immunobiology of the mouse mutant "nude". Acta path. microbiol. scand. 77, 761-762 (1969)

Rygaard, J.:

Immunodeficiency in nude mice. In: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology (Eds: Bastert, G. et al.). Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, 434-437 (1981)

Rygaard, J., Povlsen, C. O.:

Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. Acta path. microbiol. scand. 77, 758-760 (1969)

Senekowitsch, R., Baum, R. P., Baum, Maul, F. D., Wenisch, H. J. C., Möllenstädt, S., Kriegel, H., Hör, G.: Biokinetische Studien zur szintigraphischen Darstellung xenotransplantierte menschlicher Pankreas- karzinome mit ^{131}I -markierten F(ab')_2 -Fragmenten verschiedener monoklonaler Antikörper. NUC-Comp. 16, 414-425 (1985)

- Senekowitsch, R., Bode, W., Reidel, G., Glässner, H., Möllenstädt, S., Kriegel, H., Pabst, H., W.: Improved radioimmunoscintigraphy of human mammary carcinoma xenografts after injection of an anti-anti-body. Nucl.-Med. 26, 13-19 (1987)
- Senekowitsch, R., Kriegel, H.: Radiopharmazeutika für die Tumorszintigraphie - Monoklonale Antikörper. in Druck (1987)
- Sharkey, F. E., Fogh, J. M., Hajdu, S. I., Fitzgerald, P. J., Fogh, J.: Experience in surgical pathology with human tumor growth in the nude mouse. In: The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research (Eds.: Fogh, J., Giovanella, B., C.). New York: Academic Press, 188-213 (1978)
- Sharkey, F. E., Spicer, J. H., Fogh, J.: Changes in histological differentiation of human tumors transplanted to athymic nude mice: A morphometric study. Expl. Cell Biol. 53, 100-106 (1985)
- Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M., Weinberg, R. A.: Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. Nature 290, 261-264 (1981)
- Sidky, Y. A., Auerbach, R.: Lymphocyte-induced angiogenesis: A quantitative and sensitive assay of the Graft-vs-Host reaction. J. Exp. Med. 141, 1084-1100 (1975)

- Sordat, B., Fritschè, Mach, J., Carrel, S., Ozello, J., Cerottini: Morphological and functional evaluation of human solid tumors serially transplanted in nude mice. In: Proceedings of The First International Workshop on Nude Mice (Ed: Rygaard et al.). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 269-278 (1974)
- Spar, I. L., Goodland, R. L., Bale, W. F.: Localization of ^{131}I -labeled antibody to rat fibrin in a transplantable rat lymphosarcoma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 259-262 (1959)
- Staab H. J., Heilbronner, H., Schrader, M., Anderer, F. A.: In vivo induction of neoplastic growth in nude mouse connective tissue adjacent to xenografted human tumors. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 106, 27-35 (1983)
- Sternberger, L. A.: Immunocytochemistry. New York, Chichester: John Wiley and Sons (1979)
- Stewart, P. A., Clements, L. G., Wiley, M. J.: Revascularization of skin transplants into the brain: Source of the graft endothelium. Microvasc. Res. 28, 113-124 (1984)
- Taylor, C. R.: Immunoperoxidase techniques: Practical and theoretical aspects. Arch. Pathol. Lab. Med. 102, 113-121 (1978)

Visfeldt, J., Povlsen, C. O., Rygaard, J.:

Chromosome analysis of human tumours following heterotransplantation to the mouse mutant NUDE. *Acta path. microbiol. scand.* 80, 169-176 (1972)

Warenius, H., M.:

Identification and separation of mouse and human components of heterotransplanted human tumors. In: *Immunodeficient Animals for Cancer Research* (Ed.: Sparrow, S.). New York: Oxford University Press, 207-220 (1980)

Winkler, C.:

Nuklearmedizinische Tumordiagnostik. In: *Nuklearmedizin* (Hrg.: Diethelm, C.). Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 427-463 (1985)

Wirth, M. P., Ackermann, R.: Heterotransplantation of human testicular tumors in nude mice. In: *Thymus-aplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology* (Eds: Bastert, G. et al.). Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, 434-437 (1981)

Sehr herzlich möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für Betreuung und Unterstützung meiner Arbeiten bei Herrn Prof. Dr. Kriegel bedanken.

Ebenfalls ein sehr herzlicher Dank gilt Frau Dr. Dr. Senekowitsch und Herrn PD Dr. Schmahl und den von ihnen geleiteten Arbeitsgruppen.

Mein Dank gilt weiterhin besonders Herr Dr. Bode und Frau Treutler, für die zur Verfügungstellung des monoklonalen Antikörpers Ma-10-11 und die zahlreichen praktischen Anregungen. Weiterhin danke ich herzlich Frau Möllenstädt für die tatkräftige Hilfe bei den biokinetischen und immunszintigraphischen Untersuchungen, sowie Herr Dr. Glässner und Frl. Mark.

Lebenslauf:

Name: Eva Matejkova
geb. am: 6.3.59
in: Prag (Tschechoslowakei)

Schulen: 1965-1968 Volksschule Prag
1968-1970 Volks-/Hauptschule Dingolfing
1970-1972 Gymnasium Dingolfing
1972-1979 Gymnasium München
Abitur

Fachausbildung: 1979-1985 Studium der Veterinärmedizin an
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Approbation: Dezember 1985

Beschäftigung 11.1985-3.1987 wissenschaftliche
u. Dissertation: Hilfskraft an der Gesellschaft für
Strahlen- und Umweltforschung m.b.H.
(Abt. Nuklearbiologie), Neuherberg
Anfertigung der Dissertation

Seit 1.4.1987 wissenschaftlicher
Mitarbeiter im Projekt Inhalation
Neuherberg

